

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**GEWINNUNG VON ANTIKÖRPERN SPEZIFISCH FÜR
HUMANES C3 UND IHRE FLUORESCENZMARKIERUNG
MIT RHODAMIN: ANWENDUNG BEI DER
DOPPELFÄRBUNG VON BIOPTISCHEM MATERIAL**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

JENS BAUM
aus Hellendorf

Mainz 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**GEWINNUNG VON ANTIKÖRPERN SPEZIFISCH FÜR
HUMANES C3 UND IHRE FLUORESZENZMARKIERUNG
MIT RHODAMIN: ANWENDUNG BEI DER
DOPPELFÄRBUNG VON BIOPTISCHEM MATERIAL**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

JENS BAUM
aus Hellendorf

Mainz 1974

Fachbereichsdekan:

Prof. Dr. P. Klein

Referent:

Prof. Dr. U. Hadding

Korreferent:

Prof. Dr. E.-M. Lemmel



Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
B. Problemstellung	11
C. Material und Methoden	
1. CO-Gehalte	12
1. Blut	12
2. Gewebespannung	13
3. CO-Haemoglobin	14
4. Hämoglobin-Extrakt	15
5. CO-Haemoglobin	16
6. Hämoglobin-Extrakt-Haemoglobin	17
7. Hämoglobin-Extrakt-Haemoglobin	18
2. Der Gehalt an CO-Haemoglobin	19
1. Bestimmung	19
2. Bestimmung der CO-Haemoglobin	20
3. Bestimmung der CO-Haemoglobin	21
4. CO-Haemoglobin	22
5. CO-Haemoglobin	23
6. CO-Haemoglobin	24
7. CO-Haemoglobin	25
8. CO-Haemoglobin	26
9. CO-Haemoglobin	27
10. CO-Haemoglobin	28
11. CO-Haemoglobin	29
12. CO-Haemoglobin	30
13. CO-Haemoglobin	31
14. CO-Haemoglobin	32
15. CO-Haemoglobin	33
16. CO-Haemoglobin	34
17. CO-Haemoglobin	35
18. CO-Haemoglobin	36
19. CO-Haemoglobin	37
20. CO-Haemoglobin	38
21. CO-Haemoglobin	39
22. CO-Haemoglobin	40
23. CO-Haemoglobin	41
24. CO-Haemoglobin	42
25. CO-Haemoglobin	43
26. CO-Haemoglobin	44
27. CO-Haemoglobin	45
28. CO-Haemoglobin	46
29. CO-Haemoglobin	47
30. CO-Haemoglobin	48
31. CO-Haemoglobin	49
32. CO-Haemoglobin	50
33. CO-Haemoglobin	51
34. CO-Haemoglobin	52
35. CO-Haemoglobin	53
36. CO-Haemoglobin	54
37. CO-Haemoglobin	55
38. CO-Haemoglobin	56
39. CO-Haemoglobin	57
40. CO-Haemoglobin	58
41. CO-Haemoglobin	59
42. CO-Haemoglobin	60
43. CO-Haemoglobin	61
44. CO-Haemoglobin	62
45. CO-Haemoglobin	63
46. CO-Haemoglobin	64
47. CO-Haemoglobin	65
48. CO-Haemoglobin	66
49. CO-Haemoglobin	67
50. CO-Haemoglobin	68
51. CO-Haemoglobin	69
52. CO-Haemoglobin	70
53. CO-Haemoglobin	71
54. CO-Haemoglobin	72
55. CO-Haemoglobin	73
56. CO-Haemoglobin	74
57. CO-Haemoglobin	75
58. CO-Haemoglobin	76
59. CO-Haemoglobin	77
60. CO-Haemoglobin	78
61. CO-Haemoglobin	79
62. CO-Haemoglobin	80
63. CO-Haemoglobin	81
64. CO-Haemoglobin	82
65. CO-Haemoglobin	83
66. CO-Haemoglobin	84
67. CO-Haemoglobin	85
68. CO-Haemoglobin	86
69. CO-Haemoglobin	87
70. CO-Haemoglobin	88
71. CO-Haemoglobin	89
72. CO-Haemoglobin	90
73. CO-Haemoglobin	91
74. CO-Haemoglobin	92
75. CO-Haemoglobin	93
76. CO-Haemoglobin	94
77. CO-Haemoglobin	95
78. CO-Haemoglobin	96
79. CO-Haemoglobin	97
80. CO-Haemoglobin	98
81. CO-Haemoglobin	99
82. CO-Haemoglobin	100

Meiner Frau gewidmet

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung.....	1
B.	Problemstellung.....	11
C.	Material und Methoden	
I.	C3-Isolierung.....	12
1.	Puffer	12
2.	Proteinbestimmung	13
3.	C3-Nachweis	13
4.	Euglobulin-Fällung	15
5.	Chromatographien	16
6.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	18
7.	Immunologische Analysen	19
II.	Gewinnung von Anti-C3-Serum.....	20
1.	Immunisierung	20
2.	Bestimmung des Antikörpergehaltes	21
III.	Kopplung der Antikörper mit Rhodamin.....	23
1.	IgG-Reinigung	23
2.	Kopplungsmethode	24
IV.	Immunfluoreszenz - Untersuchung.....	25
D.	Ergebnisse	
I.	Reinigung von humanem C3.....	27
1.	Isolierungsschema	27
2.	Reinheitsnachweis	33
II.	Gewinnung von Antikörpern gegen C3.....	35
1.	Immunisierungsschema	35
2.	Immunologische Analyse des Antiserums	35
3.	Bestimmung des Antikörpergehaltes	37
4.	IgG-Reinigung	39
III.	Resultate der Fluoreszenzkopplung.....	39
1.	Rhodamin-markiertes Anti-C3	39
2.	Immunfluoreszenz am Gewebsschnitt	41
E.	Diskussion.....	45
F.	Zusammenfassung.....	51
G.	Literatur.....	53
H.	Lebenslauf.....	63

A. EINLEITUNG

Bei einer zunehmenden Zahl von Krankheiten werden immunpathologischen Prozessen eine auslösende oder unterhaltende Bedeutung zugemessen. Während z.B. bei der Thyreoiditis Hashimoto, der sympathischen Ophthalmie und der Coombs-positiven Anämie kein Zweifel mehr an der immunpathologischen Genese des Krankheitsgeschehens besteht, wird zunehmend auch bei Krankheiten wie z.B. der atrophischen Gastritis, der chronisch aggressiven Hepatitis, der Colitis ulcerosa u.a. ebenfalls eine immunologisch bedingte Gewebeschädigung diskutiert (Zusammenfassende Übersicht: 48). Es erscheint in Hinblick auf die Diagnose der in Frage kommenden Krankheitsbilder daher von grundsätzlicher Bedeutung, pathogenetisch wirksame "Immunprodukte" oder durch sie verursachte Gewebsschäden nachzuweisen und zu differenzieren. Hieraus kann sich dann die Möglichkeit der kausalen Therapie ergeben.

Es stellt sich die Frage nach dem pathogenetischem Prinzip immunologischer Krankheiten. Hier können heute zumindest vier Gruppen unterschieden werden:

1. Der Organismus reagiert gegen die Antigene seines eigenen Körpers. Dieser Vorgang wird auch als Autoimmunisierung bezeichnet. Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, daß im menschlichen Organismus eine Anzahl von Autoantigenen existieren, die vom Immunsystem als fremd angesehen werden. So kennt man heute Autoantigene z.B. Spermien im Hoden (29), Thyreoglobulin in der Schilddrüse (45) und Autoantigene in der Augenlinse (21, 53), die eine Antikörperbildung im eigenen Organismus induzieren können. Daß dies physiologischerweise nicht geschieht, liegt an der anato-

misch bedingten Verborgenheit dieser Autoantigene, die somit nicht in Kontakt mit den immunkompetenten Zellen treten können. Die Abgeschlossenheit kann aber durch Trauma, Infektionen, Entzündungen etc. durchbrochen werden. So kann z.B. bei der Infektion mit dem Mumps-Virus die anatomische Schranke zwischen Spermien und dem Immunsystem durchbrochen werden, was zu einer Autosensibilisierung gegen Spermien führt. Dies ist die pathophysiologische Grundlage der bei Mumps auftretenden Orchitis (1). Als zweites Beispiel sei die sympathische Ophthalmie genannt, bei der, durch ein Trauma bedingt, Autoantigene der Netzhaut freigesetzt werden. Die daraus resultierende Autosensibilisierung verursacht zusätzlich eine Entzündung des nicht verletzten Auges (47, 50). Auch die Thyreoiditis Hashimoto gehört in diese Krankheitsgruppe. Hier können präzipitierende Antikörper gegen Thyreoglobulin im Blut nachgewiesen werden (16).

2. Es besteht einerseits die Möglichkeit, daß der Organismus gegen fremde Antigene reagiert, die in ihrem Determinantenmuster körpereigenen Strukturen ähnlich sind. Die dabei gebildeten Antikörper kreuzreagieren mit den erwähnten Determinanten des eigenen Gewebes. Andererseits ist es vorstellbar, daß Veränderungen körpereigener Strukturen zustande kommen können durch Röntgen- oder Ultraviolettbestrahlung, mutagene Chemikalien, Medikamente oder Enzyme z.B. bei Infektionen mit Mikroorganismen. Diese alterierten Strukturen werden vom Organismus als fremd angesehen. Er reagiert auf sie mit Antikörperbildung, von deren Auswirkung im Sinne einer Kreuzreaktion auch nicht verändertes Gewebe erfaßt wird. In diesem Zusammenhang ist der Lupus ery-

thematodes visceralis zu nennen. Man stellt sich vor, daß bei dieser Krankheit entweder die durch Viren veränderte körpereigene DNA oder aber eine der körpereigenen DNA ähnlichen Virus-DNA zur Antikörperbildung führen könnte (Übersicht bei: 24). Diese Antikörper sind als "antinukleäre Faktoren" bekannt.

3. Bei der eigentlichen physiologischen Aufgabe des Immunsystems, nämlich der Reaktion mit von außen zugeführten Antigenen, treten Antigen-Antikörper-Komplexe (Immunaggregate) auf, die ihrerseits das Komplementsystem aktivieren und binden. Im Normalfall führt dies zu einer Antigen-Neutralisation. Kommt es aber pathologischerweise zur Ablagerung dieser Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexe z.B. an den Endothelien, so resultiert das Krankheitsbild des Anaphylaktischen Schocks oder der Immunvasculitis, die sich z.B. als Immunkomplex-Nephritis oder als Serumkrankheit manifestiert (13, 14, 18, 31).

4. Es werden Haptene, z.B. Pharmaka, an eigenes Gewebe gebunden. Das Hapten wird durch den körpereigenen Träger zum Vollantigen komplettiert und löst so Antikörperbildung aus. Die daraus entstehenden Immunaggregate und die Komplementbindung führen zu einer Schädigung der betroffenen Zellen. Als Beispiele sind hier zu nennen: a) die immunhämolytische Anämie, bei der ein Medikament die Rolle des Haptens spielt (34, 51); b) die Penicillin-Allergie (10) und c) die Kontakt-Dermatitis (3), die im Zuge einer allgemeinen Zunahme von Chemikalien in unserer Umwelt ständig an Bedeutung gewinnt.

Bisher wurde als Immunantwort des Organismus lediglich die Bildung von Antikörpern beschrieben. Es ist aber wichtig festzuhalten, daß die spezifische Immunantwort der Vertebraten Ausdruck von zwei un-

abhängig voneinander reagierenden Funktionssystemen sein kann. Träger der Reaktionsbereitschaft sind in beiden Fällen zunächst kleine, morphologisch nicht unterscheidbare Lymphozyten. Ein Teil der Lymphozyten (B-Zellen) ist in der Lage, nach entsprechender antigener Reizung spezifische Antikörper (Immunglobuline) zu bilden: diese sind die Funktionsträger der "humoralen" Immunantwort. Ein anderer Teil der Lymphozyten (T-Zellen) führt nach direktem Kontakt mit den ihnen entsprechenden Antigenen zu deren Zerstörung. Immunologisch wirksame Faktoren in der Zirkulation können für dieses Immunsystem nicht nachgewiesen werden. Die Immunaktivität der T-Zellen wird als "zelluläre" Immunität bezeichnet.

1. Im humoralen System wird die Interaktion der Antikörper mit den korrespondierenden Antigenen wegen ihrer Schnelligkeit als "Reaktion vom Soforttyp" bezeichnet. Hierbei wird Komplement an den Antigen-Antikörper-Komplex gebunden. Wie unten noch ausführlich beschrieben, ist es in der humoralen Immunantwort die Komplementaktivierung, die zum pathogenetischen Faktor werden kann. Eindrucksvolles Beispiel einer Sofortreaktion ist der Anaphylaktische Schock.

2. Im zellulären System wird die Reaktion der T-Zellen mit den ihnen korrespondierenden Antigenen wegen des langsamen Reaktionsablaufes als "Reaktion vom verzögerten Typ" bezeichnet. Als Beispiel hierfür sei die Tuberkulinreaktion und die Transplantatabstoßung genannt.

Beiden Immunsystemen kommt grundsätzlich eine den Organismus schützende Funktion zu, die jedoch entsprechend den oben angeführten theoretischen Möglichkeiten zu pathologischen Begleiter-

scheinungen oder gegebenenfalls auch zu einer direkten Schädigung des Gewebes führen kann. Gemeinsames morphologisches Merkmal einer Gewebsschädigung, die nach Reaktion von Antikörpern oder T-Zellen mit den korrespondierenden Antigenen entstehen kann, ist die Entzündung. Sie ist die pathophysiologische Grundlage der als Folge immunologischer Reaktionen auftretenden Krankheitsbilder. Während für den Nachweis einer durch T-Zellen bedingten Entzündung sichere diagnostische Parameter weitgehend fehlen, muß für die Diagnose einer durch Antikörper bedingten Entzündung der Nachweis von Antikörpern und Komplement im histologischen Präparat gefordert werden.

Wie bereits erwähnt, ist es die Komplementbindung, die den immunpathologischen Prozess einleitet oder unterhält. Wegen dieser wichtigen Rolle soll hier in Kürze das Komplementsystem und dessen biologische Bedeutung geschildert werden.

Das Komplementsystem (46) wird heute folgendermaßen definiert: Es handelt sich um ein System von Proteinen des Normalserums bestehend aus 9 Einzelkomponenten C1 - C9, die unter definierten Bedingungen und nach Ablauf einer Reaktionssequenz fähig sind, antikörperbeladene Erythrozyten zu lysieren. Dabei werden biologisch aktive Substanzen freigesetzt, die für den Entzündungsvorgang von wesentlicher Bedeutung sind. Da die Einzelkomponenten nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung numeriert wurden, ergibt sich folgende Reaktionssequenz:

C1 - C4 - C2 - C3 - C5 - C6 - C7 - C8 - C9

Alle Komplementkomponenten sind im nativen Zustand inaktiv. Es sind grundsätzlich drei Möglichkeiten der Komplementaktivierung bekannt:

1. Aktivierung durch einen Antigen-Antikörper-Komplex. Die bei dieser Komplexbildung hervorgerufene Konformationsänderung am Fc-Stück des Antikörpers (IgG oder IgM) bewirkt eine Aktivierung von C1, das seinerseits C4 aktiviert etc. (27). Der Ablauf der Sequenz ist in Abb. 1 (Seite 7) dargestellt.

2. Nebenschluß-Aktivierung ("alternate pathway", "bypass activation"). In neuerer Zeit hat man entdeckt, daß die Komplementaktivierung auch unter Umgehung von C1, C4 und C2 ablaufen kann (19). Die "Initialzündung" läuft in diesem Fall bei dritten Komplementkomponente, dem C3, ab und wird durch zusätzliche Serumfaktoren bewirkt. Man kennt heute einige Substanzen, die dazu fähig sind, z.B. Lipopolysaccharide aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (Endotoxin) (12), Cobratoxin (26), verschiedene Polyanionen (22), Gamma-1-Globulin-Immunaggregate vom Meerschweinchen (32) und andere mehr (19).

3. Letztlich kann eine direkte Aktivierung von C3 durch enzymatische Einwirkung hervorgerufen werden. Man weiß heute, daß z.B. Plasmin, Trypsin und Proteasen aus Geweben und Mikroorganismen dazu fähig sind (8, 54).

Die in der Definition angegebene Zytolyse ist nur eine Teilfunktion des Komplements. Bei dem Ablauf der Reaktionssequenz werden einige für die Entzündung sehr aktive Stoffe gebildet. Man weiß heute, daß diese bei der Aktivierung von C3 und C5 freigesetzt werden.

Der bei der Aktivierung von C3 abgespaltene Anteil des Moleküls, der nicht an den Antigen-Antikörper-Komplex gebunden wird, wird als C3a bezeichnet und besitzt Anaphylatoxin-Aktivität. Das C3a

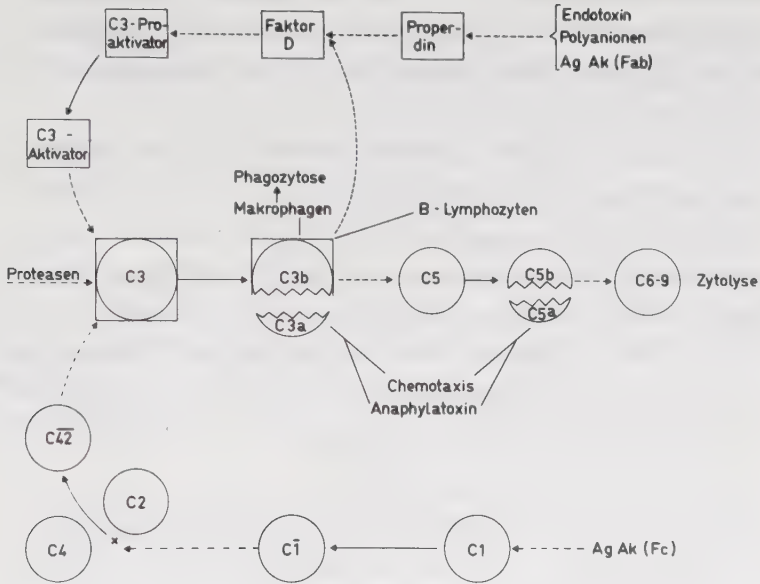


Abb. 1 Reaktionssequenz des Komplementsystems

(aus : Hadding, U., Bitter-Suermann, D.: Das Komplementsystem und seine Funktion; Deutsches Ärzteblatt, 71, 932 (1974)

setzt aus Mastzellen Histamin frei, steigert somit die Vasopermeabilität und verursacht eine Kontraktion der glatten Muskulatur des Meerschweinchenileums (9, 11). C3a hat weiterhin chemotaktische Eigenschaften, d.h. es verursacht eine Wanderung der Leukozyten aus den Kapillaren in das Gewebe zum Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion (23).

Der an den Immunkomplex gebundene Anteil des C3, das C3b, bedingt das Phänomen der Immunadhärenz (41). Hierauf ist die Opsonisierung, die Phagozytoeerleichterung für Makrophagen, zurückzuführen (17, 28). Darüberhinaus hat man in den letzten Jahren gefunden, daß Makrophagen und die B-Zellen C3b-Rezeptoren tragen (4, 5, 25). Da diese Zellen an den zentralen Vorgängen bei der Auslösung der Antikörperbildung beteiligt sind, könnte C3b hierbei ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen.

Aus dieser kurzen Schilderung ergibt sich die zentrale Stellung des C3 im Komplementsystem. Seine Konzentration im humanen Serum ist auffallend hoch: sie ist mit 0,8 - 1,2 mg/ml um das 10-100fache höher als die der übrigen Komplementkomponenten. Seiner elektrophoretischen Wanderung nach wurde natives C3 als β_{1C} -Globulin bezeichnet, während es z.B. nach Alterung wegen seiner veränderten Wanderungsgeschwindigkeit den Namen β_{1A} -Globulin trägt (42).

Die mannigfaltigen biologischen Effekte des C3 (Abb. 2, Seite 9) lassen die entzündlichen Vorgänge bei einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit Komplementbindung plausibel erscheinen. Es ist daher von grundlegender Wichtigkeit, Antikörper und Komplement im Gewebe nachzuweisen. Dies gelingt am besten mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie. Für den Ig-Nachweis verwendet man ein mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) markiertes Anti-Ig-Serum, daß bei

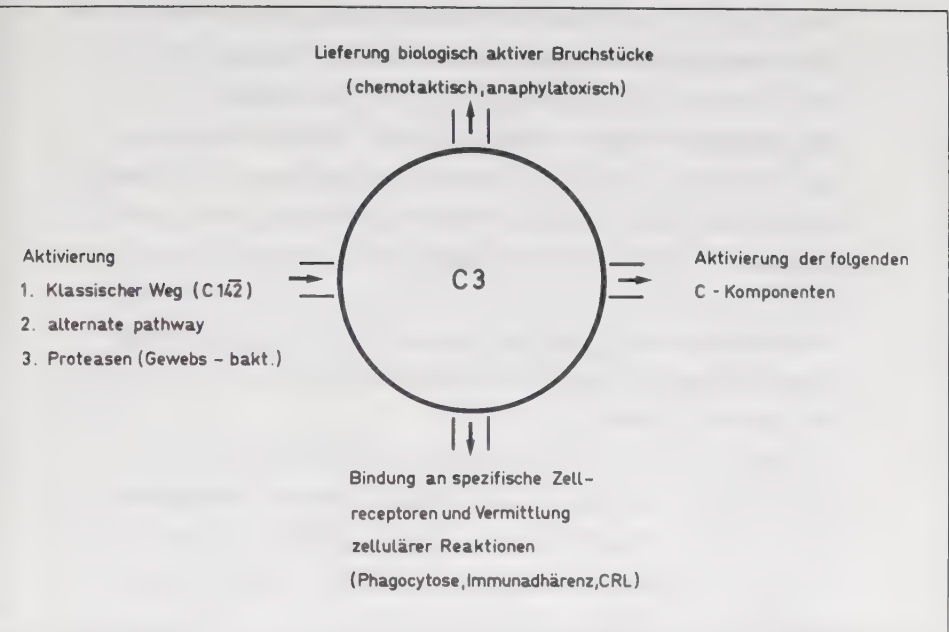


Abb. 2 Biologische Effekte der dritten Komplementkomponente (C3)

UV-Bestrahlung in einem gelblich-grünen Farbton fluoresziiert.

Für den Komplementnachweis verwendet man ein Antiserum gegen C3 (stellvertretend für das Komplement), das üblicherweise ebenso mit FITC markiert worden ist. Mit Hilfe dieser beiden Antiseren ist jedoch der getrennte Nachweis von Ig und C3 nur auf verschiedenen, nacheinanderfolgenden Gewebsschnitten möglich.

Dies allerdings ist unbefriedigend und nicht beweiskräftig für einen Antikörper-Komplement-Komplex. Das Vorliegen eines derartigen Komplexes erscheint nur dann als erwiesen, wenn seine Reaktionspartner in dem gleichen Präparat gleichzeitig und in enger räumlicher Nachbarschaft nachgewiesen und voneinander differenziert werden können. Erst der Nachweis von Antikörper-Komplement-Komplexen auf einem Gewebsschnitt und an einem Gewebsteil kann als Beweis eines immunologisch bedingten Krankheitsgeschehens gelten.

Ein gangbarer Weg ist die Markierung der für den Nachweis der Reaktionspartner benötigten Antiseren mit Fluoreszenz-Farbstoffen unterschiedlicher Farbqualität. Dies ist z.B. möglich bei Verwendung des FITC (gelblich-grüner Farbton) und von Rhodamin andererseits (orange-roter Farbton).

In den vorliegenden Untersuchungen bleibt das Anti-Ig-Serum FITC-markiert; zum Nachweis von Komplement im Gewebe wird in dieser Arbeit ein Anti-C3-Serum hergestellt, das mit einem Rhodamin-Farbstoff gekoppelt wird.

B. PROBLEMSTELLUNG

Ausgehend von der Notwendigkeit eines gleichzeitigen Nachweises von Immunglobulinen und C3 in humanem Biopsie-Material soll es die Aufgabe dieser Arbeit sein, ein mit Rhodamin markiertes Anti-C3-Serum zu gewinnen. Hierzu waren folgende Einzelaufgaben zu lösen :

1. Isolierung von C3 aus humanem Plasma : Hierfür liegen bereits Angaben vor, die jedoch im allgemeinen nur zu funktionell reinem C3 führten, das noch kontaminierende Proteine enthielt. Es mußte daher ein Isolierungsschema für proteinchemisch reines C3 entwickelt werden.
2. Gewinnung eines Anti-C3-Serums : Mit dem gereinigten C3 sollte eine Ziege immunisiert und Antiserum in großer Menge gewonnen werden.
3. Isolierung der IgG-Fraktion aus diesem Antiserum und Markierung der IgG mit einem Rhodamin-Farbstoff.
4. Anwendung der Doppelfärbung an histologischen Präparaten : Es sollte gezeigt werden, daß die mit dem so gewonnenen Rhodamin-markierten Anti-C3 erreichte Fluoreszenz sich in der Farbqualität gut von der des FITC-markierten Anti-Ig-Serums unterscheidet.

In der vorliegenden Arbeit werden nichtpathologische Dünndarm-Biosien zur Differenzierung in der Doppelfärbung verwendet.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. C3 - Isolierung

1. Puffer

(a) Für Chromatographien: Es wurde 0,05 m Kaliumphosphatpuffer pH 8 verwendet, im folgenden als K-PO_4 bezeichnet. Die Leitfähigkeit wurde als Millisiemens (mS) mit einem Radiometer gemessen. Bei 20° C entspricht eine 0,02 m NaCl-Lösung 2 mS. Zur Vereinfachung wurde der Phosphatpuffer nach dem pH-Wert und der Leitfähigkeit eingestellt.

(b) Für den C3-Nachweis: Isotone Kochsalzlösung, die mit Veronal auf pH 7,5 eingestellt worden war. Diesem Puffer wurde nach MAYER (38) Ca^{++} (0,001 m), Mg^{++} (0,001 m) und Gelatine (0,1 %) zugesetzt. Die Konzentrationsangaben stellen Endkonzentrationen dar. Im folgenden wird dieser Puffer als MPG (Mayer-Puffer + Gelatine) bezeichnet.

(c) Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

Elektrodenpuffer: Glycin 28,8 g
 Tris 6,0 g
 H_2O ad 10000 ml

Elutionspuffer: 0,02 m Tris-HCl pH 7,5 + NaCl bis zu einer Leitfähigkeit von 15 mS (" + 15 mS NaCl")

(d) Zusatz von Äthylendiamintetraacetat (EDTA) zu einigen Puffern führt zur Chelierung von Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen. Beim Fehlen dieser Ionen sind C1 und C3 funktionell blockiert.

2. Proteinbestimmung

Für die quantitative Proteinbestimmung wurde entweder die von LOWRY (35) angegebene Methode oder die photometrische Messung bei 280 nm angewendet. Eine Eichkurve wurde mit reinem Humanserum-Albumin erstellt.

Quantitative C3-Bestimmung wurde mittels M-Partigen-Immunodiffusionsplatten (M-Partigen-C3c) der Behringwerke durchgeführt. Diese Methode beruht auf der von MANCINI (36) angegebenen Technik.

3. C3 - Nachweis

Hämolytisch aktives C3 wurde im Mikrolitersystem (44) nachgewiesen. Folgende Reagenzien wurden verwendet:

(a) MPG: siehe Seite 12

(b) R 3 - Reagens: 5 mg Cobragift ("Naja Naja", Miami Serpentarium Laboratories, Miami, USA) wurden pro ml Meerschweinchen-serum gelöst und das Gemisch 60 min. bei 37° C inkubiert. Diese Behandlung führt zur Aktivierung von C3 und C5 mit nachfolgendem Aktivitätsverlust. C1, C4 und C2 werden nicht beeinflusst (30).

(c) R 4 - Reagens: 20 ml Meerschweinchen-serum wurden mit 5 ml einer 0,16 m Hydrazinhydroxid-Lösung gemischt, 30 min. bei 37° C inkubiert und mit 0,15 n HCl auf pH 7,2 eingestellt. Durch diese Behandlung werden C4 und C3 selektiv zerstört (30).

(d) EAC142: Sensibilisierte Hammelerythrozyten (EA) wurden wie von RINGELMANN u.a. (44) beschrieben hergestellt. Die Zellen (5×10^8 EA/ml) wurden 10 min. bei 37° C mit gleichem Volumen

R 3 (mit MPG 1 : 40 verdünnt) inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit kaltem MPG gewaschen (je 10 min. bei 3000 RpM) und mit MPG im Ausgangsvolumen aufgenommen. Die Beladung der EA mit C1, C4 und C2 wurde folgendermaßen kontrolliert :

400 μ l MPG

200 μ l C3 - C9 (8 ml MPG + 1 ml 0,2 m EDTA
pH 7,5 + 1 ml Meerschweinenserum)

200 μ l EAC142 (5×10^8 / ml)

Dieser Ansatz wurde bei 37° C inkubiert und die Zeit bis zur vollständigen Lyse der Zellen gemessen. Optimale EAC142 sollen in diesem Test innerhalb von 2 min. zu 100 % lysieren.

Um die für den C3-Nachweis erforderliche Konzentration von $1,3 \times 10^8$ Zellen / ml genau einzustellen, wurde zunächst die genaue Konzentration der EAC142 bestimmt. Hierzu wurden 100 μ l der Zellen mit H₂O 1 : 100 verdünnt, im Photometer bei 412 nm gemessen und mittels einer Eichkurve die genaue Konzentration bestimmt. Anschließend wurde der notwendige Verdünnungsfaktor für den gesuchten Wert ermittelt und die Zellen entsprechend mit MPG verdünnt. Die Testansätze für den C3-Nachweis waren wie folgt :

Hauptansatz 100 μ l MPG

1000 μ l C5 - C9 (R 4, mit MPG 1 : 2500
verdünnt)

100 μ l Probe

100 μ l EAC142 ($1,3 \times 10^8$ / ml)

100 % Lysewert

1200 μ l H₂O

100 μ l EAC142

Zellkontrolle

1200 μ l MPG

100 μ l EAC142

Kontrolle des	200 μ l MPG
Testsystems	1000 μ l C3 - C9 (s.o.)
	100 μ l EAC142

Die Ansätze wurden bis zum Endpunkt der Hämolysereaktion 60 min. bei 37° C inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde der Überstand mit dem Photometer bei 412 nm auf seinen Hämoglobingehalt hin untersucht. Die optische Dichte (OD) des freigesetzten Hämoglobins ist direkt proportional zum Betrag an hämolytisch aktivem C3.

Die hämolytische Aktivität wurde in "site-forming-units" (SFU) / ml ausgedrückt (6, 44).

4. Euglobulin - Fällung

Vorbemerkung: Bei der Isolierung von C3 sowie bei der Weiterbearbeitung des Antiserums wurde darauf geachtet, daß die Proteinlösungen ständig auf einer Temperatur von 4° C gehalten wurden. Das Aufbewahren von Proteinlösungen erfolgte in der Regel bei -70° C.

Ausgangsmaterial für die Isolierung war frisches menschliches Plasma, das von der Transfusionszentrale Mainz bezogen wurde. Dort wurde dem Plasma ACD-Stabilisator zugesetzt.

Zur Gerinnung wurden 400 ml Plasma dialysiert in 2 x 10 l 0,9 % NaCl, 0,1 % CaCl_2 und 0,01 % Natriumazid (zur Hemmung von Bakterienwachstum) für 24 Stunden. Danach wurde das Fibrin entfernt durch Zentrifugation bei 4000 RpM für 30 min.

Für die Euglobulin-Fällung wurde das so gewonnene Serum mit 20 ml 0,2 m EDTA pH 5,4 (zur Verhinderung von C3-Verlusten) versetzt und erneut dialysiert in 2 x 10 l 0,02 m K-PO_4 pH 5,4 mit 0,01 % Natriumazid, ebenfalls für 24 Stunden. Das dabei entstandene Prä-

zipitat, die Euglobuline, wurde abzentrifugiert bei 8000 RpM für 15 min., zweimal mit 600 ml 0,02 m K-PO_4 pH 5,4 gewaschen und anschließend in 10 ml 0,2 m K-PO_4 pH 8 gelöst. Die Euglobuline und der Überstand, die Pseudoglobuline, wurden auf ihren Proteingehalt bei 280 nm und auf ihre hämolytische C3-Aktivität, ausgedrückt in SFU/ml kontrolliert.

5. Chromatographien

a. DEAE - Chromatographie

Eine Säule (5 x 30 cm) wurde 20 cm hoch mit DEAE-Zellulose (Whatman DE 52) gefüllt und mit dem Startpuffer, 0,05 m K-PO_4 pH 8, äquilibriert. Die Euglobuline wurden mit H_2O auf 5 mS verdünnt, aufgetragen und die Säule mit dem Startpuffer gespült, bis kein Protein mehr eluiert wurde. Danach wurde ein Gradient von steigender Leitfähigkeit und abfallendem pH angeschlossen: 1000 ml Startpuffer in einem 2 l - Gefäß wurden durch eine kommunizierende Röhre mit 600 ml 0,25 m NaH_2PO_4 in einem 1 l - Gefäß verbunden, sodaß sich die Gefäßböden und Flüssigkeitsspiegel je in derselben Ebene befanden. Gesammelt wurden 250 Tropfen je Fraktion. Die Fraktionen wurden im Mikrolitersystem auf C3 getestet. Der C3-Pool wurde anschließend mit 1 n NaOH auf pH 8 gebracht und auf 5 mS verdünnt.

b. CaOH - Apatit - Chromatographie

Herstellung des CaOH-Apatits: Es wurde die von BITTER-SUERMAN u. a. (7) angegebene Methode angewendet. 1 l einer 2,1 m $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ - Lösung und 1 l einer 2,0 m K_2HPO_4 - Lösung wurden langsam unter Rühren in einen Behälter getropft, der zuvor mit 500 ml

H₂O gefüllt worden war. Die entstandenen Kristalle (2 m CaHPO₄ x H₂O) wurden viermal in etwa 5 l H₂O gewaschen und anschließend wieder in 500 ml H₂O aufgeschwemmt. Die Kristalle wurden auf 56° C erhitzt, mit 2 Mol KOH (250 ml einer 45 %igen KOH-Lösung) versetzt und das Gemisch 2 Stunden bei 56° C unter Rühren gehalten. Danach wurde das Gemisch, CaOH-Apatit, viermal in 5 l H₂O gewaschen und mit 1 n HCl auf pH 8 eingestellt. Anschließend wurde das Apatit einmal in dem Startpuffer, 0,05 m K-PO₄ pH 8 gewaschen und wieder in Startpuffer suspendiert.

Durchführung der Chromatographie: Eine Säule (5 x 30 cm) wurde 20 cm hoch mit dem CaOH-Apatit gefüllt und mit dem Startpuffer äquilibriert. Der C3-Pool von der DEAE-Säule wurde aufgetragen und die Säule mit 300 ml Startpuffer gespült. Eluiert wurde mit einem Gradienten von steigender Phosphatkonzentration: 1000 ml Startpuffer gegen 1000 ml 0,2 m K-PO₄ pH 8. Es wurden 250 Tropfen je Fraktion gesammelt. Der C3-Pool wurde mit H₂O auf 5 mS verdünnt und das pH ggf. auf 8 nachgestellt.

c. DEAE - Chromatographie

Die Säule wurde entsprechend Punkt a. vorbereitet. Der Pool von der CaOH-Apatit-Säule wurde aufgetragen und die Säule mit Startpuffer gespült. Diesmal wurde ein Gradient mit steigender NaCl-Konzentration angeschlossen: 1000 ml Startpuffer gegen 1000 ml Startpuffer + NaCl bis zu einer Leitfähigkeit von 20 mS. Es wurden 250 Tropfen je Fraktion gesammelt. Der C3-Pool wurde dann in einer Desaga-Anlage auf 5 ml ankonzentriert. Hierbei wird durch Unterdruck Flüssigkeit aus mit dem C3-Pool gefüllten Dialysesschläuchen entfernt.

6. Polyacrylamidgel - Elektrophorese (PAA)

a. Präparative PAA

Verwendet wurde das Gerät "UltraPhor" der COLORA Meßtechnik GmbH, 7083 Lorch. Die Durchführung folgte im Wesentlichen der Bedienungsanleitung für das Gerät; lediglich der Elektrodenpuffer wurde verdünnter, nämlich wie bei der analytischen PAA angesetzt (siehe Seite 12). Das Elektrophoresesystem war folgendes: Diskontinuierliches Gelsystem; Konzentrierung bei pH 8,3; Trennung bei pH 9,5; Anode unten. Benutzt wurde ein 7 %iges Trenngel, das 10 cm hoch in eine 5 mm-Trennkammer eingefüllt wurde. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und der Taschenformer soweit hineingetaucht, daß eine Sammelgelhöhe von 2 cm entstand. Nach der Polymerisation des Sammelgels und Entfernung des Taschenformers wurden die Elektrophorese- und Trennkammern mit dem Elektrodenpuffer gefüllt. Die Probe (2 ml) wurde mit gleichem Volumen einer Mischung aus SammelgelstammLösung und Riboflavin (3:1), 20 % Glyzerin und 2 ml einer 0,001 %igen Bromphenolblaulösung versetzt und direkt auf den Boden der Sammelgeltasche mit einer langen Kanüle dem Elektrodenpuffer unterschichtet. Darauf wurde die Elektrophorese gestartet. Die Stromleistung betrug bei der Wanderung der Bromphenolblaubande im Sammelgel 20 W, im Trenngel 50 W. Nach 8 Stunden wurde die Elektrophorese abgebrochen und das Gel in 0,5 cm breite horizontale Streifen geschnitten, nachdem zuvor ein vertikaler Randstreifen auf beiden Seiten für die Färbung abgetrennt worden war. Die horizontalen Streifen wurden mit einer Spritze mechanisch zerkleinert und in je 10 ml Tris-Puffer (siehe Seite 12) eluiert. Es wurde auf möglichst weitgehende Homogenisation geachtet. Nach 2 Tagen wurden die Eluate

auf der Partigenplatte auf den C3-Gehalt hin getestet. Darauf wurde C3-haltiges Gel-Puffer-Gemisch nochmals in ca. 150 ml Tris-Puffer eluiert, nach 1 Tag abfiltriert und das Filtrat so an-konzentriert, daß ein C3-Gehalt von 1 mg/ml resultierte.

b. Analytische PAA

Hierfür wurde die Disk-Elektrophorese-Einrichtung von Shandon (Shandon Labortechnik, Frankfurt) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie von MAURER (37) beschrieben. Das Gelsystem entsprach dem der präparativen PAA. Die Dauer der Elektrophorese betrug ca. 70 min. bei der Stromstärke von 5 mA pro Gelzylinder, bis die Bromphenolblaubande eben gerade aus dem Gel ausgetreten war. Die Gelzylinder wurden 20 min. in einer Amidoschwarzlösung (0,55 g Amidoschwarz 10 B + 100 ml 7%ige Essigsäure) gefärbt. Als Entfärbelösung diente ein Gemisch aus Methanol : Eisessig : H₂O (45 : 10 : 45). Die entfärbten Gelzylinder wurden in 7%iger Essigsäure aufbewahrt.

7. Immunologische Analysen

a. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophoresen wurden entsprechend der Mikromethode nach SCHEIDEGGER (49) durchgeführt. Trägermaterial war 1%iger Agar, der mit 0,001 m EDTA und 0,01 % Natriumazid versetzt war. Die Antiseren (Anti-Humanserum, Anti- β_{1C}/β_{1A}) wurden von den Behringwerken bezogen. Es wurden je 5 μ l der Proben und 100 μ l der Antiseren eingefüllt. Die Dauer der Elektrophorese betrug bei der Austestung des Anti-C3-Serums 90 min., bei dem Reinheitsnachweis 3 Stunden. Die Spannung betrug 9 V/cm.

Nach einer Entwicklungszeit von 24 Stunden wurde 48 Stunden in reichlich 1 %iger NaCl-Lösung gewässert und die Präparate anschließend getrocknet. Die Färbung erfolgte in Coomassie Brilliant Blau für 10 min. Färbelösung:

5 g Coomassie Brilliant Blau R 250
450 ml Äthanol

100 ml Eisessig

450 ml H₂O

Danach wurde ausgiebig in Entfärbelösung (siehe analytische PAA, Seite 19) entfärbt und die Präparate getrocknet.

b. Doppelimmundiffusion nach OUCHTERLONY (43)

Das Trägermaterial für die Doppelimmundiffusion war ebenfalls 1 %iger Agar mit EDTA und Natriumazid. Es wurden jeweils 5 µl in die Löcher eingefüllt. Nach einer Entwicklungszeit von 24 Stunden wurden die Präparate wie unter a. beschrieben weiterbearbeitet.

II. Gewinnung von Anti - C3 - Serum

1. Immunisierung

Immunisierungsmaterial war hochgereinigtes C3. Für die Injektion wurde 1 ml des C3-Präparates (1 mg / ml) mit 1 ml komplettem Freund'schen Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, USA) in einer Spritze gemischt. Injiziert wurde subkutan an zwei Stellen der Brust einer Ziege. Zur Blutgewinnung wurde die V. jugularis punktiert. Es wurden jeweils ca. 200 ml Blut entnommen. Das Ziegenblut wurde bis zur vollständigen Gerinnung bei Zimmertemperatur aufbewahrt und anschließend 10 min. bei 5000 Rpm zentrifugiert.

2. Bestimmung des Antikörper - Gehaltes

a. Titerbestimmung

Der Antikörpertiter des Anti-C3-Serums wurde mittels Agglutination von EAC1423-Zellen in einer Verdünnungsreihe bestimmt.

Herstellung von EAC1423: Es wurden EAC142 (5×10^8 / ml) (siehe Seite 13) mit dem gleichen Volumen gereinigtem, humanem C3 (ca. 1×10^8 SFU / ml) gemischt und 10 min. bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit kaltem MPG gewaschen und mit MPG auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Die Beladung der EAC142 mit C3 wurde mit folgendem Ansatz kontrolliert:

400 µl MPG

200 µl EAC1423 (5×10^8 / ml)

200 µl C5 - C9 (R 4 mit MPG 1 : 80 verdünnt)

Dieser Ansatz wurde bei 37° C inkubiert und die Zeit bis zur vollständigen Lyse der Zellen gemessen. Optimale EAC1423 sollen innerhalb von 3 min. zu 100 % lysieren.

Durchführung der Titerbestimmung: Es wurde das Mikrotiter-Besteck der Cooke Engineering, Alexandria, USA verwendet. Auf der Titerplatte wurde eine Verdünnungsreihe des Anti-C3-Serums mit MPG (Volumina je 25 µl) hergestellt. Das Anti-C3-Serum wurde zuvor 30 min. bei 56° C inaktiviert, um Hämolyse zu verhindern. Kontrollansätze wurden mit Ziegennormalserum und MPG durchgeführt. Anschließend wurden je 25 µl EAC1423 (5×10^8 / ml) hinzuge tropft und die Ansätze 30 min. bei 37° C inkubiert. Nach weiteren 30 min. bei Zimmertemperatur wurde der Agglutinationstiter abgelesen. Als positiv galt eine großflächige Ablagerung der Zellen; im negativen Falle sedimentierten die Zellen in einem kleinen Bereich (Knopfbildung).

b. Bestimmung der Bindungskapazität des Anti-C3-Serums

Für die Routinekontrollen während der Aufbereitung des Anti-C3-Serums wurde der Antikörpergehalt mittels Bestimmung der C3-Bindungskapazität durch Immunabsorption gemessen. Hierfür wurde von dem Anti-C3-Serum oder von den gereinigten Antikörpern eine Verdünnungsreihe mit 0,9 % NaCl hergestellt (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8) und in folgenden Ansätzen benutzt:

Hauptansatz	100 μ l Anti-C3-Serum in verschiedenen Verdünnungen
	100 μ l Humanserum
Ziegenserumkontrolle	100 μ l Ziegennormalserum
	100 μ l Humanserum
Humanserumkontrolle	100 μ l Humanserum
	100 μ l 0,9 % NaCl

Die Ansätze wurden 1 Stunde bei 37⁰ C und 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Danach wurden alle Ansätze zentrifugiert und die Überstände mittels Partigenplatten auf den C3-Gehalt hin getestet.

Für die Grundlage der Berechnung der C3-Bindungskapazität wurde der C3-Schwund aus dem Humanserum bei der Inkubation mit dem Anti-C3-Serum herangezogen.

Der C3-Gehalt der Überstände wurde mittels Standardseren und Eichkurve bestimmt (in mg/ml). Die ermittelten Werte wurden mit 2 multipliziert (Humanserum 1 : 2 verdünnt in allen Ansätzen). Danach wurde die Differenz zwischen der Ziegenserumkontrolle und dem Hauptansatz ermittelt. Diese Differenz, multipliziert mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor des Anti-C3-Serums, ergibt die Bindungskapazität in mg C3 pro ml Anti-C3-Serum.

III. Kopplung der Antikörper mit Rhodamin

1. IgG - Reinigung

a. Ammoniumsulfat-Fällung

Es wurden 50 ml Anti-C3-Serum mit 50 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung pH 7,5 gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 15 min. wurde 10 min. bei 10 000 Rpm zentrifugiert und das Präzipitat, die IgG-Fraktion, mit H_2O auf das ursprüngliche Serumvolumen aufgenommen und gelöst. Danach wurde das Präzipitationsverfahren wiederholt. Um das überschüssige Ammoniumsulfat zu entfernen, wurde die IgG-Fraktion 48 Stunden in 2×10 l 0,02 m $K-PO_4$ pH 8 dialysiert. Das dabei entstandene Präzipitat, die Euglobuline, wurde abzentrifugiert.

b. DEAE-Chromatographie

Eine Säule (4 x 30 cm) wurde 20 cm hoch mit DEAE-Zellulose gefüllt und mit Startpuffer, 0,02 m $K-PO_4$ pH 8, äquilibriert. Die IgG-Fraktion wurde aufgetragen und die Säule mit dem Startpuffer gespült. Nachdem die Immunglobuline mit dem Startpuffer eluiert worden waren, wurde die Säule mit 2 m NaCl gewaschen, ausgiebig mit Startpuffer gespült und erneut verwendet. Die Immunglobuline wurden auf 5 ml ankonzentriert.

c. Sephadex G 200 Gelfiltration

Eine Säule (5 x 100 cm) wurde mit Sephadex G 200 gefüllt und mit 0,02 m Tris-HCl pH 7,5 + 15 mS NaCl gespült. Der ankonzentrierte DEAE-Pool wurde aufgetragen und mit dem Tris-Puffer eluiert. Gesammelt wurden 200 Tropfen je Fraktion. Die 7 s - Fraktion (IgG) wurde gepoolt und so ankonzentriert, daß ein Proteingehalt von etwa 40 mg/ml resultierte.

2. Kopplungsmethode

a. Kopplung mit Rhodamin

Für die Kopplung wurde Lissamin-Rhodamin-B-200-chlorid (RB 200) der Fa. Serva, Heidelberg verwendet, welches ein 5 %iges Farbstoffadsorbat auf Kieselgur ist. Etwa 5 ml IgG-Lösung wurden mit 10 ml 0,1 m Natriumkarbonatpuffer pH 9 versetzt und pro mg Protein 1 mg Farbstoffadsorbat hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 min. unter Rühren wurden die Kieselgurpartikel abfiltriert.

b. Sephadex G 25 Gelfiltration

Um den überschüssigen Farbstoff aus dem Rhodamin-markierten Anti-C3 (= Rhodamin - Anti - C3) zu entfernen, wurde eine Gelfiltration mit Sephadex G 25 durchgeführt. Die Säule (5 x 40 cm) wurde mit "phosphate buffered saline" pH 7,5 (Na_2HPO_4 12 g; NaH_2PO_4 2,2 g; NaCl 85 g; H_2O ad 10 000 ml) gewaschen. Nach dem Auftragen des Rhodamin-Anti-C3 wurde mit dem Puffer eluiert. Die markierten IgG wurden im Ausschlußvolumen wiedergewonnen und auf 10 ml ankonzentriert. Zur Kontrolle der Elimination von freiem Farbstoff wurde das Rhodamin-Anti-C3 12 Stunden in 10 l "phosphate buffered saline" (s.o.) dialysiert und die evt. aufgetretenen geringen Mengen von Präzipitaten abzentrifugiert. Die Säule wurde nach ausgiebigem Spülen wiederverwendet.

IV. Immunfluoreszenz - Untersuchung

Für diese Untersuchung wurde das auf 10 ml ankonzentrierte Rhodamin-Anti-C3 (siehe Seite 24) verwendet.

Als Material für die histologischen Präparate dienten Dünndarm-Saugbiopsien, die freundlicherweise von der gastroenterologischen Ambulanz der I. Medizinischen Universitätsklinik Mainz (Prof. Ewe) zur Verfügung gestellt wurden. Die histologischen Präparate wurden als Kryostat-Gefrierschnitte auf Objektträgern angefertigt. Die fluoreszenzserologische Bearbeitung dieser Präparate wurde folgendermaßen vorgenommen:

1. Inkubation der Präparate 60 min. bei 37° C;
2. Waschen in Phosphatpuffer 3 x 5 min.
(Na_2HPO_4 14,8 g; KH_2PO_4 4,3 g; NaCl 68 g; H_2O ad 10 l)
3. Trocknen der Präparate;
4. Je 1 Tropfen Fluoreszenz-Antiserum auf jedes Präparat;
5. Inkubation bei 25° C 45 min. in der feuchten Kammer;
6. Waschen in Phosphatpuffer (s.o.) und Trocknen;
7. Abdecken der Präparate mit 1 Tropfen Glyzerin und mit einem Deckgläschen.

Bei Doppelfärbungen wurde zuerst mit dem FITC-Anti-Ig wie oben beschrieben vorgegangen. Nach Punkt 6. (Waschschritt) folgte die Markierung der gleichen Präparate mit Rhodamin-Anti-C3 nach demselben Schema (4. - 7.).

Die Spezifitätskontrolle für die C3-Markierungen erfolgte entsprechend der oben beschriebenen Methode in folgender Weise: zuerst Inkubation des Gewebsschnittes mit nicht-markiertem Anti-C3 der Behringwerke (Anti- β_{1C} / β_{1A}); danach Inkubation mit dem Rhodamin-Anti-C3.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Leitz Mikroskop Ortho-

plan (Okular : Periplan GW 10 x MF; Objektiv : Phaco 40 / o.65; Auflicht-UV-Bestrahlung nach Ploem).

Die Fluoreszenzbilder wurden photographiert mit der Photoeinrichtung für dieses Mikroskop: Leitz Orthomat. Verwendet wurde grundsätzlich wegen seiner Farbgenauigkeit der Farbumkehrfilm Agfa CT 18. Für das Photographieren der Rhodamin-Einzelfärbungen erwies sich die Verwendung des Farbnegativfilms Kodachrome II als optimal. Die Belichtungszeiten betrugen je nach Helligkeit der Fluoreszenzbilder 3 - 5 min.

D. ERGEBNISSE

I. Reinigung von humanem C3

1. Isolierungsschema

Um reines C3 aus humanem Plasma zu gewinnen, wurde in verschiedenen Experimentalserien das folgende Schema mit insgesamt 6 Reinigungsschritten als optimal ermittelt:

1. Gerinnung
2. Euglobulin-Fällung
3. DEAE-Chromatographie
4. CaOH-Apatit-Chromatographie
5. DEAE-Chromatographie
6. Präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Da hämolytisch aktives C3 ein recht empfindliches Molekül ist, wurde eine möglichst schonende und rasche Reinigung bei 4° C angestrebt. Die Gerinnung als erster Reinigungsschritt erwies sich als notwendig, weil sonst aus nicht näher bekannten Gründen die Gerinnung während der Euglobulin-Fällung ablief und erheblich die Bearbeitung der Euglobuline erschwerte.

Die Effektivität der Euglobulin-Fällung wurde durch Messung bei 280 nm sowie durch Bestimmung der SFU/ml kontrolliert. Es ergaben sich im Durchschnitt der Präparationen folgende Ergebnisse:

Serum	70 mg Protein / ml	$6,0 \times 10^9$ SFU / ml
Pseudoglobuline	60 mg Protein / ml	$6,0 \times 10^7$ SFU / ml
Euglobuline	10 mg Protein / ml	$5,5 \times 10^9$ SFU / ml
	(bezogen auf ursprüngliches Serumvolumen)	

Die Euglobuline enthielten also ca. 14 % der Serumproteine und ca. 92 % der Serum-SFU.

Die wesentlichen Reinigungsschritte stellten die Anionenaustausch-Chromatographien dar. Hier war es möglich, das C3 aus den Eoglobulinen soweit zu reinigen, daß es bei einer Analyse in der analytischen PAA nur 2 feine, schnellerwandernde kontaminierende Proteinbanden zeigte. Diese ließen sich durch eine Gelfiltration mit Sephadex G 200 nicht eliminieren. Bei der Untersuchung in der Immunelektrophorese zeigte dieses C3 gegenüber Anti-Humanserum nur eine Präzipitationsbande.

Der auf 5 ml ankonzentrierte C3-Pool hatte eine Proteinkonzentration von ca. 7 mg/ml.

Für die drei Chromatographieschritte ergibt sich folgendes Schema:

Material	Gradient	Elutionsbedingung für humanes C3
DEAE	pH - Gradient	pH 6,4 $\pm$ 0,1
	1000 ml 0,05 m K-PO ₄ pH 8	
	→ 600 ml 0,25 m NaH ₂ PO ₄	
CaOH - Apatit	Leitfähigkeits - Gradient	8,5 mS $\pm$ 1,0
	1000 ml 0,05 m K-PO ₄ pH 8	
	→ 1000 ml 0,2 m K-PO ₄ pH 8	
DEAE	Leitfähigkeits - Gradient	11,5 mS $\pm$ 0,5
	1000 ml 0,05 m K-PO ₄ pH 8	
	→ 1000 ml 0,05 m K-PO ₄ pH 8	
	+ 20 mS NaCl	

Die folgenden Abbildungen 3 - 5 geben typische Elutionsdiagramme für die drei beschriebenen Chromatographieschritte wieder.

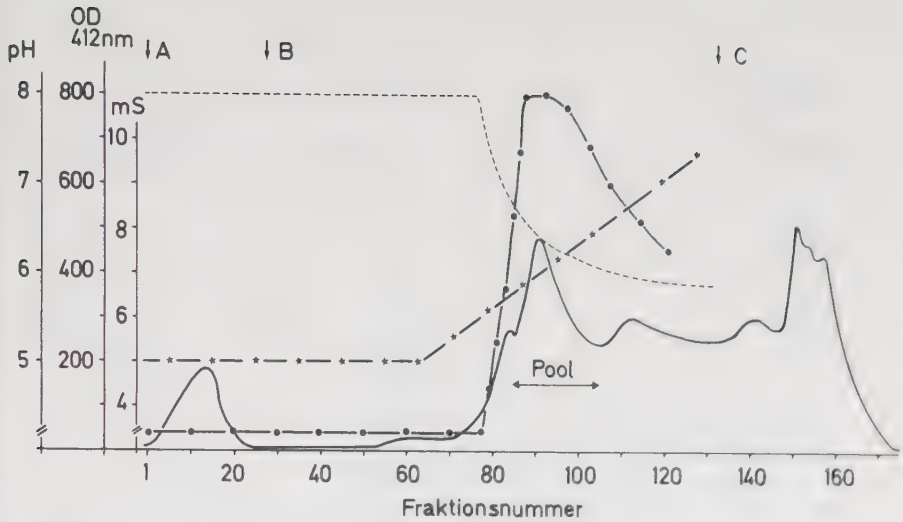


Abb. 3 C3 - Reinigung: Elutionsdiagramm des ersten Chromatographiestrittes mit DEAE

A: Spülen mit Startpuffer (0,05 m K-PO_4 pH 8)

B: pH - Gradient (siehe Seite 28)

C: Spülen mit 2 m NaCl

— relative Proteinkonzentration (256 nm)

----- pH - Wert

-x-x- Leitfähigkeit in mS

—•— hämolytische C3-Aktivität im Mikrolitertest

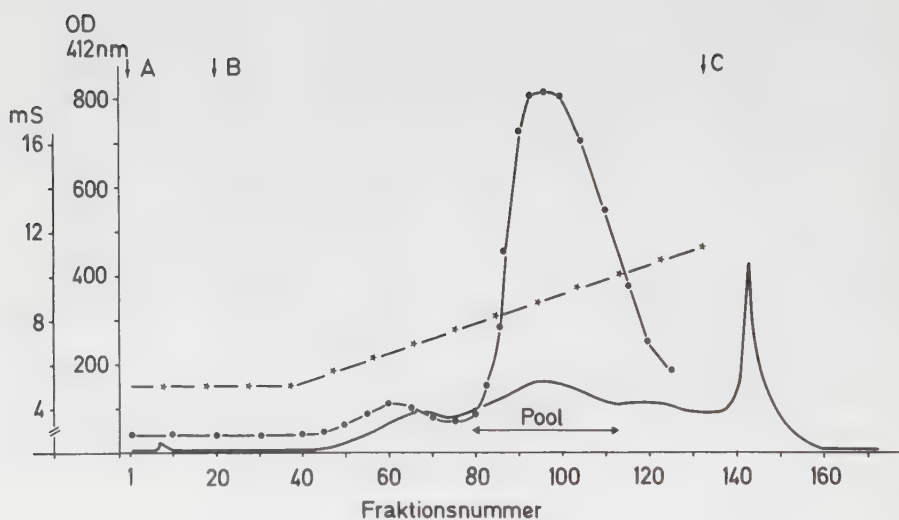


Abb. 4 C3 - Reinigung: Elutionsdiagramm des zweiten Chromatographieschrittes mit CaOH-Apatit

A: Spülen mit Startpuffer (0,05 m K-PO₄ pH 8)

B: Leitfähigkeits - Gradient (siehe Seite 28)

C: Spülen mit 1,0 m K-PO₄ pH 8

— relative Proteinkonzentration (256 nm)

-x-x Leitfähigkeit in mS

—•— hämolytische C3-Aktivität im Mikrolitertest

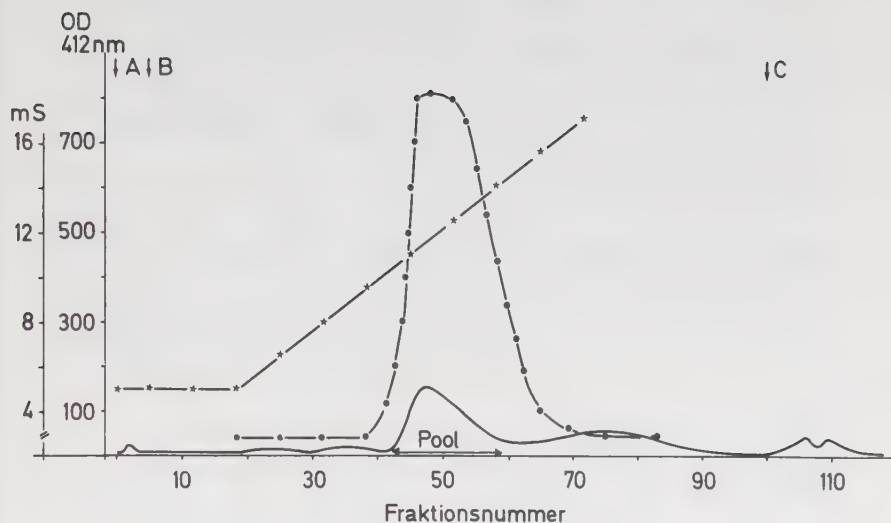


Abb. 5 C3 - Reinigung: Elutionsdiagramm des dritten Chromatographieschrittes mit DEAE

A: Spülen mit Startpuffer (0,05 m K-PO_4 pH 8)

B: Leitfähigkeits - Gradient (siehe Seite 28)

C: Spülen mit 2 m NaCl

— relative Proteinkonzentration (256 nm)

- x - x Leitfähigkeit in mS

—●—●— hämolytische C3 - Aktivität im Mikrolitertest

Es soll erwähnt werden, daß die einzelnen Fraktionen mit dem Mikrolitertest auf C3 hin untersucht wurden, obwohl dieses Testsystem aus Meerschweinchen-Komplementfaktoren besteht. Man kann damit dennoch sehr gut humanes C3 nachweisen. Zwar liegen die gefundenen OD-Werte um einiges niedriger als die Werte bei Verwendung von Meerschweinchen-C3, aber diese Tatsache wirkte sich bei der Testung der Fraktionen nicht aus, weil C3 meist in solch einem Überschuß vorlag, daß bei einigen Fraktionen der 100 % - Lysewert erreicht wurde.

Als letzter Schritt der Reinigung wurde die präparative PAA durchgeführt. Dies war möglich, weil die beiden Kontaminanten in der analytischen PAA einen genügend großen Abstand zur Hauptbande hatten (ca. 1 cm). Die Einwirkung der hohen Stromleistung führte zu einem weitgehenden Verlust der hämolytischen Aktivität; dies wurde jedoch bewußt in Kauf genommen, da die Antigenität des C3-Moleküls erhalten blieb. Um eine besonders hohe Ausbeute bei diesem Verfahren zu erhalten, wurde die Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution versucht. Jedoch war es nicht möglich, C3 im Eluat in nennenswerten Mengen wiederzufinden. Deshalb wurde die Elution nach mechanischer Zerkleinerung des Gels durchgeführt. Die Färbung des vertikalen Randstreifens diente dazu, die elektrophoretische Trennung zu kontrollieren. Die Bandenkonfiguration entsprach der bei der analytischen PAA, sodaß bei 0,5 cm breiten Streifen eine vollständige Trennung gewährleistet war. Die Fraktion, die bei der Testung auf der Partigplatte am stärksten C3-haltig war, entsprach genau der Hauptbande. In dieser Fraktion ließ sich auch eine sehr schwache hämolytische C3-Aktivität nachweisen.

Das auf diese Weise gereinigte C3 hatte nach Ankonzentrierung einen Proteingehalt von 1 mg/ml.

2. Reinheitsnachweis

Die Reinheit des C3-Präparates wurde mit der Immunelektrophorese und der analytischen PAA kontrolliert.

In der Immunelektrophorese (Abb. 6, Seite 34) zeigte sich bei der Entwicklung gegen Anti-Humanserum nur eine Präzipitationsbande. Bei der Entwicklung desselben Präparates mit Anti- β_{1C}/β_{1A} formte sich eine Präzipitationsbande in der gleichen Position. Das Anti-Humanserum erfaßt somit das C3 und zeigt weiterhin, daß keine präzipitierbaren Kontaminanten mehr vorliegen. Die Präzipitationsbande des gereinigten C3 ist gegenüber der aus frischem Humanserum anodisch verschoben. Das Phänomen dieser anodischen Wanderung ist die Folge einer Alterung bzw. Inaktivierung des nativen C3, die man auch als Konversion bezeichnet (39).

Die analytische PAA zählt heute zu den empfindlichsten Proteinnachweismethoden. Sie wurde daher als zusätzliche Kontrolle unabhängig von den antigenen Eigenschaften des C3-Präparates zu dessen Reinheitskontrolle herangezogen. Wie in Abb. 7 (Seite 34) dargestellt, war nur eine einzige Proteinbande zu erkennen, deren Position der in der Literatur angegebenen entspricht.

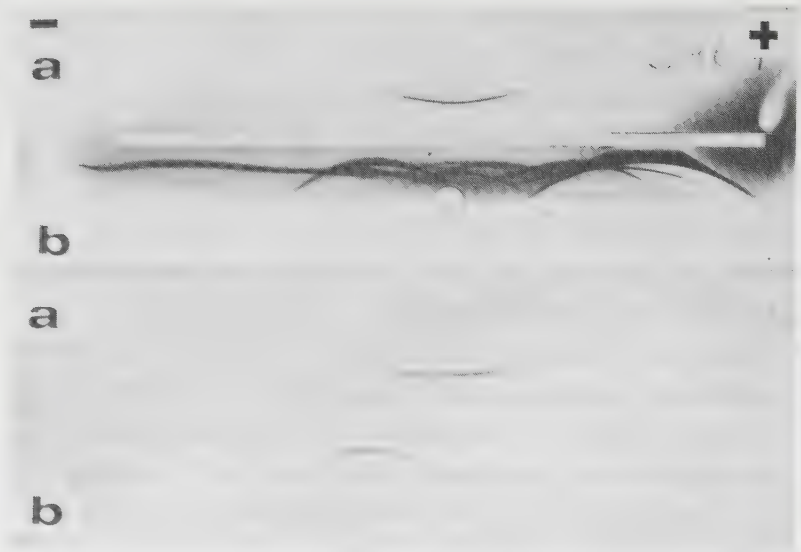


Abb. 6 Immunelektrophorese in 1 %igem Agar

a: gereinigtes C3

b: Humanserum

obere Rinne: Anti-Humanserum

untere Rinne: Anti- β_{1C}/β_{1A}

Laufzeit: 3 Stunden bei 9 V/cm



Abb. 7 Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese

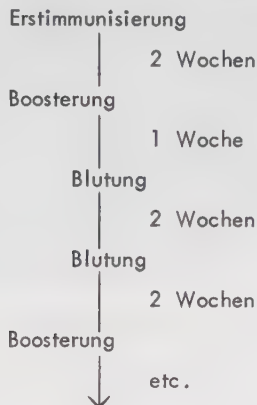
Auftrag: gereinigtes C3 (20 μ g)

Laufzeit: 70 min. bei 5 mA

11. Gewinnung von Antikörpern gegen C3

1. Immunisierungsschema

Für die Immunisierungen wurde eine Ziege gewählt, um eine große Menge Antiserum gewinnen zu können. Es wurde nach folgendem Schema vorgegangen (Einzelheiten siehe Seite 20):



2. Immunologische Analyse des Anti-C3-Serums

Die wichtigste Untersuchung bestand zunächst in dem Nachweis der Monospezifität des Anti-C3-Serums. Hierzu wurden Immunelektrophoresen durchgeführt.

Dabei ergab sich, wie in Abb. 8 (Seite 36) ersichtlich, nur eine Präzipitationsbande zwischen dem Anti-C3-Serum und dem Humanserum.

Es zeigte sich, daß das Anti-C3-Serum sowohl das native als auch das mit Cobratoxin konvertierte C3 im Humanserum ("Humanserum/Cobra") erfaßt. Bei der Inkubation mit Cobratoxin (30 min. bei 37° C) wird durch Nebenschluß-Aktivierung das native C3 in C3a

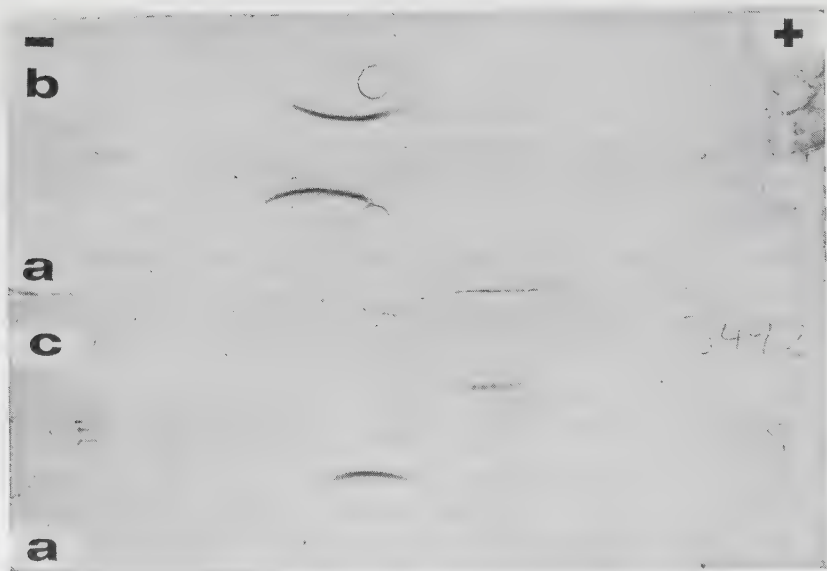


Abb. 8 Immunelektrophorese in 1 %igem Agar

a: Humanserum

b: Humanserum/Cobra (siehe Seite 35)

Rinnen: Anti-C3-Ziegenserum

Laufzeit: oben 90 min., unten 3 Stunden bei 9 V/cm

c: gereinigtes C3

und C3b gespalten (30). Das Anti-C3-Serum präzipitiert demnach keine weiteren Proteine aus dem Humanserum.

Der Nachweis, daß das präzipitierte Protein tatsächlich das C3 ist, wurde in der Elektrophorese des gereinigten C3 nach der präparativen PAA und der Entwicklung gegen das Anti-C3-Serum geführt. Hier zeigten sich Banden, die denen zwischen Humanserum und Anti-C3-Serum entsprechen. Auch hier sieht man ei-

ne anodische Verschiebung der C3-Bande des gereinigten Präparates gegenüber der aus frischem Humanserum.

In Experimenten mit der Doppelimmundiffusion nach OUCHTERLONY wurde untersucht, ob es zu einer Spornbildung der C3-Bande des frischen Serums über die C3-Bande der konvertierten Serums kommt. Es zeigte sich sowohl mit dem Anti-C3-Serum als auch mit dem kommerziellen Anti- β_{1C}/β_{1A} keine Spornbildung. Hieraus kann geschlossen werden, daß beide Antiseren Antikörper gegen die Determinanten A und D des C3 enthalten, aber nicht gegen die Determinante B, die nur im nativen C3 vorkommt (52).

3. Bestimmung des Antikörpergehaltes

a. Titerbestimmung

Um den Antikörpertiter mit der Bestimmung des Agglutinationstiters von Erythrozyten festzustellen, mußten die Erythrozyten mit humanem C3 beladen werden. Als Ausgangsmaterial boten sich die EAC142 an, die für den C3-Nachweis benötigt werden (siehe Seite 13). Die Meerschweinchenkomplementfaktoren, mit denen die EA beladen worden sind, sind in der Lage, humanes C3 zu aktivieren und zu binden. Diese Tatsache, aufgrund derer man auch humanes C3 im Meerschweinchenkomplement-Testsystem nachweisen kann, wurde für die Bestimmung des Agglutinationstiters ausgenutzt. Um eine optimale Beladung der EAC142 mit humanem C3 zu erreichen, wurde C3 im Überschuß dem Ansatz zugesetzt. Diese Methode erfordert es jedoch, gereinigtes C3 zu verwenden.

Die Titerbestimmung mit dieser Methode ergab folgende Ergebnisse :

Anti-C3-Agglutinationstiter im

Ziegennormalserum	1 : 32
Anti- β_{1C}/β_{1A} (Behringwerke)	1 : 128
Anti-C3-Ziegenserum	1 : 1024

Die im Ziegennormalserum gefundene Agglutination ist durch natürlicherweise vorkommende Antikörper gegen die benutzten Erythrozyten bedingt und hat nichts mit einer Antikörper-Spezifität gegen humanes C3 zu tun.

b. Bestimmung der Bindungskapazität

Eine einfachere Methode für die Bestimmung des Antikörpergehaltes ist die Messung der C3-Bindungskapazität durch Immunabsorption.

Hierzu wurde unverdünntes Humanserum mit Anti-C3-Serum in verschiedenen Verdünnungen versetzt und anschließend gemessen, wieviel C3 noch nachzuweisen war. Als Kontrolle diente Ziegennormalserum.

Zunächst zeigte sich, daß ein C3-Verlust durch Zusatz von Ziegennormalserum auf der Partigenplatte nicht nachzuweisen war. Weiterhin ergab sich, daß das Anti-C3-Ziegenserum eine C3-Bindungskapazität von knapp 100 % hat, d.h. das gesamte C3 im Humanserum wird in einem Reaktionsschritt gebunden.

Es zeigten sich folgende Ergebnisse :

C3-Bindungskapazität pro ml

Anti- β_{1C}/β_{1A} (Behringwerke)	0,4 - 0,5 mg C3
Anti-C3-Ziegenserum	0,9 - 1,0 mg C3

Normales Serum enthält im Durchschnitt 0,8 - 1,2 mg C3 pro ml.

4. IgG - Reinigung

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung am Gewebsschnitt ist es wichtig, eine möglichst geringe unspezifische Färbung zu haben. Dies läßt sich erreichen durch Benutzung reiner IgG-Fraktionen. Eine Ammoniumsulfatfällung als alleinige Reinigung der Immunglobuline des Anti-C3-Ziegenserums wurde daher nicht für ausreichend gehalten. Es wurde vielmehr die Reinigung von 7s-IgG aus dem Anti-C3-Ziegenserum angestrebt. Nur so schien eine ausreichende Gewähr für eine hohe spezifische Färbung bei sehr geringer unspezifischer Färbung gegeben zu sein.

Die Reinigung von 7s-IgG wurde in insgesamt drei Schritten durchgeführt:

1. Zweimalige Fällung in 50 %igem Ammoniumsulfat
2. DEAE - Chromatographie
3. Sephadex G 200 Gelfiltration

Aus 50 ml Anti-C3-Ziegenserum konnten auf diese Weise ca. 10 ml 7s-IgG mit einem Proteingehalt von 40 mg/ml gewonnen werden.

III. Resultate der Fluoreszenzkopplung

1. Rhodamin-markiertes Anti-C3 (Rhodamin-Anti-C3)

Die Fluoreszenz-Markierung der Anti-C3-IgG bestand im Wesentlichen aus zwei Schritten:

1. Kopplung der Anti-C3-IgG mit Rhodamin
2. Gelfiltration mit Sephadex G 25

Die Entfernung des freien Farbstoffes gelang mit Hilfe der Gel-filtration vollständig. Das Volumenverhältnis Sephadex G 25 : Rhodamin-Anti-C3 betrug dabei 10 : 1. Bei der Kontrollidialyse zeigte sich, daß keine sichtbaren Mengen an freiem Farbstoff im Rhodamin-Anti-C3 mehr vorhanden war. Die während der Dialyse aufgetretenen geringen Mengen an Präzipitaten sind wahrscheinlich auf übermarkierte IgG zurückzuführen. Als Endprodukt wurden 10 ml Rhodamin-Anti-C3 gewonnen. Der Proteingehalt war weder mit der Folin-Methode noch durch Messung bei 280 nm bestimmbar, da der Rhodamin-Farbstoff in beiden Wellenbereichen absorbiert.

Die Testung des Rhodamin-Anti-C3 bestand demnach aus zwei Kontrollen :

a. Bestimmung des Antikörpergehaltes (siehe Seite 37/38)

Es ergaben sich folgende Daten :

Agglutinationstiter-Bestimmung

FITC-markiertes Anti- β_{1C}/β_{1A} (Behringwerke)	1:128
Rhodamin-Anti-C3	1:512

C3-Bindungskapazität pro ml

FITC-markiertes Anti- β_{1C}/β_{1A}	ca. 0,4 mg C3
Rhodamin-Anti-C3	0,8-0,9 mg C3

b. Kontrolle der Monospezifität

Die Monospezifität des Rhodamin-Anti-C3 wurde mit der Immunelektrophorese kontrolliert. Hier zeigten sich die gleichen Ergebnisse wie bei der Testung des Anti-C3-Ziegen-serums (siehe Seite 35),

d.h. auch das Rhodamin-Anti-C3 präzipitiert aus dem Humanserum nur das C3. (Über Spezifitätskontrollen bei der Fluoreszenzmikroskopie siehe Seite 48/49).

2. Immunfluoreszenz am Gewebsschnitt

Die Abbildungen 9-12 (Seite 43/44) geben typische Bilder von Mono- und Doppelfärbungen wieder. Es sind jeweils Strukturen von quergeschnittenen Dünndarmkrypten zu sehen.

a. Abbildung 9 (Abzug von einem Farbnegativfilm)

Es handelt sich um eine alleinige Färbung mit dem Rhodamin-Anti-C3. Man erkennt deutlich im Interstitium gelegene, orange-rot angefärbte Bezirke, die als C3-haltige Zellen zu deuten sind. Bei einigen Zellen erkennt man eine Farbstoffaussparung im Sinne eines Zellkerns. Dieser Zellkern ist im Verhältnis zum Zytoplasma relativ klein. Der Farbton und besonders die Farbintensität heben sich deutlich von dem nur schwach rötlich gefärbten Hintergrund ab.

b. Abbildung 10 (Abzug von einem Diapositiv)

Hier handelt es sich um eine alleinige Färbung mit dem FITC-markierten Anti-IgA der Behringwerke. Entsprechend Abb. 9 sieht man auch hier im Interstitium gelegene Zellen, die gelblich-grün angefärbt worden sind. Diese sind als IgA-haltige Zellen zu deuten. Diese Zellen haben jedoch, wie in Abb. 11 und 12 besonders gut erkennbar, einen größeren Zellkern als die C3-haltigen Zellen. Im Lumen der Dünndarmkrypten ist außerdem IgA-haltiger Schleim (Dünndarmsekret) angefärbt worden.

c. Abbildungen 11 und 12 (Abzüge von Diapositiven)

Hier sind die Ergebnisse von Doppelfärbungen mit FITC-markiertem Anti-IgA und dem Rhodamin-Anti-C3 zu sehen. Man erkennt orange-rot angefärbte zelluläre Strukturen, die denen in Abb. 9 entsprechen. Zusätzlich sind gelblich-grüne Zellen zu erkennen, die denen in Abb. 10 ähnlich sind. Die von dem Rhodamin-Anti-C3 angefärbten Zellen zeigen eine Zytoplasma-Zellkern-Relation zugunsten des Zytoplasmas. Die von dem FITC-Anti-IgA angefärbten Zellen sehen deutlich anders aus. Sie imponieren, wie in Abb. 12 besonders gut sichtbar, durch einen relativ großen Zellkern. Im Lumen der Krypten erkennt man auch hier von dem FITC-Anti-IgA angefärbtes, IgA-haltiges Dünndarm-Sekret.

Die Spezifitätskontrolle für das Rhodamin-Anti-C3 ergab nach Vorinkubation mit nicht-markiertem, kommerziellem Anti- β_{1C}/β_{1A} keine Anfärbung der beschriebenen Strukturen durch das Rhodamin-Anti-C3.

Diese Abbildungen zeigen, daß sich die mit dem FITC-Anti-IgA angefärbten Zellen in der Farbqualität deutlich von denen mit dem Rhodamin-Anti-C3 angefärbten Zellen unterscheiden.

Eine sichere Differenzierung der unterschiedlich angefärbten Strukturen ist bei Verwendung von kommerziellem FITC-Anti-IgA-Serum (und entsprechend anderen FITC-Anti-Ig-Seren) und dem Rhodamin-Anti-C3, wie die Abbildungen deutlich zeigen, gut möglich.



Abb. 9 Fluoreszenzfärbung mit Rhodamin-Anti-C3

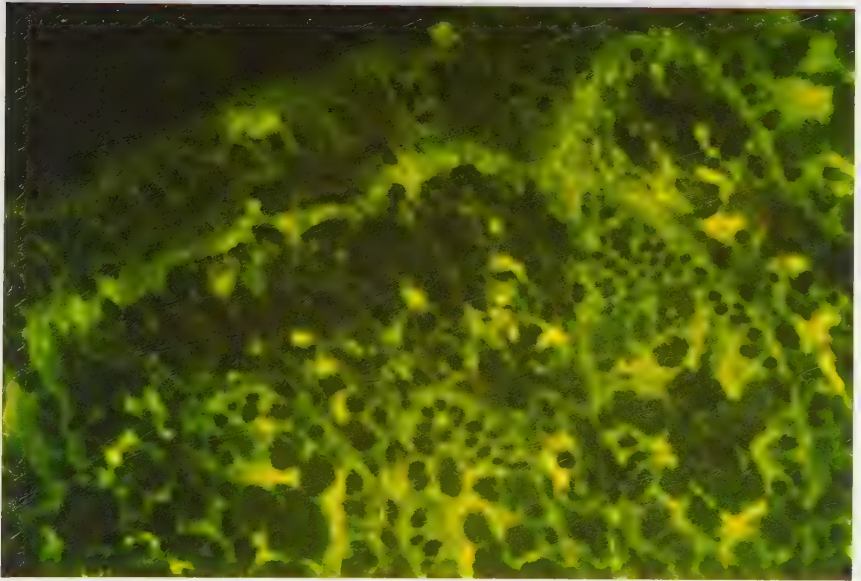


Abb. 10 Fluoreszenzfärbung mit FITC-Anti-IgA

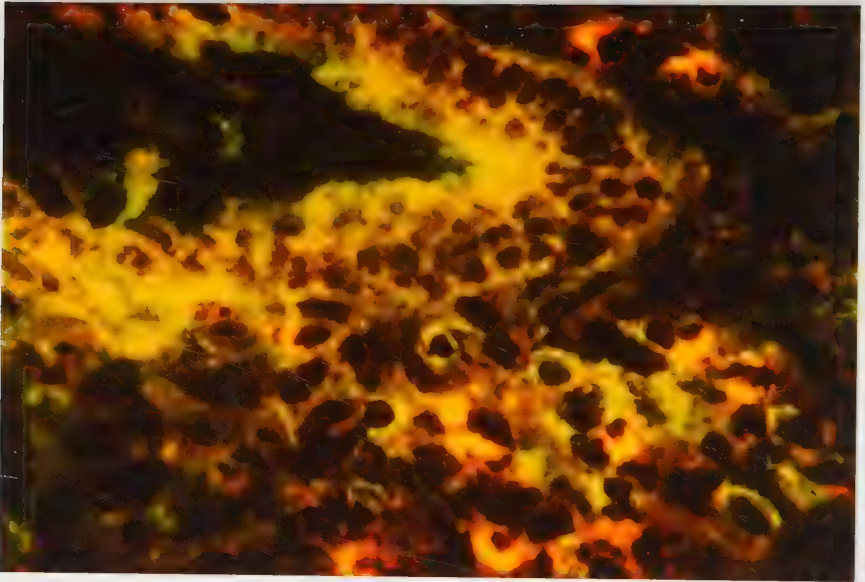


Abb. 11 Fluoreszenzdoppelfärbung mit FITC-Anti-IgA und Rhodamin-Anti-C3

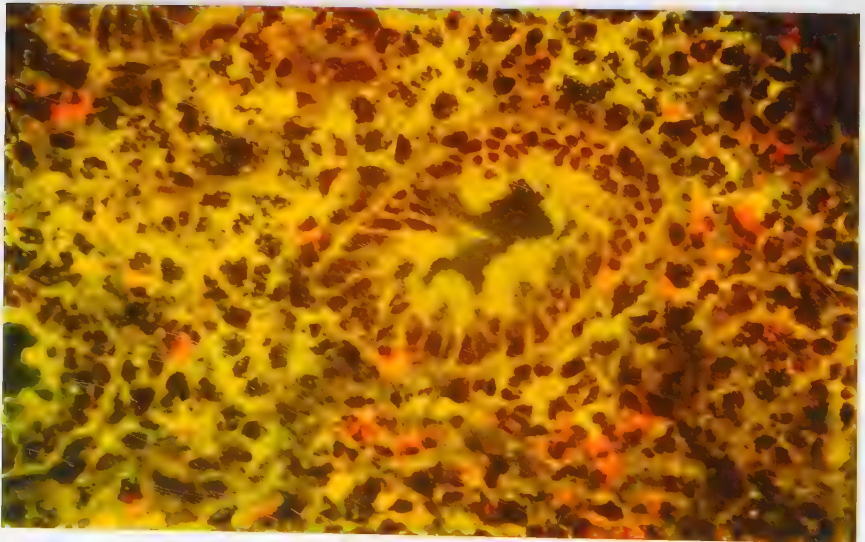


Abb. 12 Fluoreszenzdoppelfärbung mit FITC-Anti-IgA und Rhodamin-Anti-C3

E. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit ist eine Methode zur Gewinnung von monospezifischen Anti-C3-Immunglobulinen und deren Markierung mit einem Rhodamin-Farbstoff beschrieben worden. Dabei fällt der hohe methodische Aufwand für die C3-Reinigung auf, der höher ist als der für die Aufbereitung des Antiserums. Aber gerade für die Aufgaben, bei denen das Rhodamin-Anti-C3 eingesetzt werden soll -- nämlich den Doppelfärbungen --, ist das Wichtigste die Monospezifität der benutzten Antiseren. Nur auf diese Weise lassen sich zuverlässige Doppelfärbungen bei geringer Hintergrundfärbung erreichen. Es stellte sich somit als Hauptproblem die Monospezifität der Anti-C3-Immunglobuline. Der herkömmliche Weg, der z.B. auch bei der kommerziellen Gewinnung von Anti-Seren beschritten wird, besteht darin, ein Tier mit einem C3-Präparat zu immunisieren, das noch kontaminierende Proteine enthält. Die unerwünschten Antikörper werden dann durch Immunabsorption mit C3-freiem Humanserum eliminiert.

Weil bei dieser Methode keine volle Monospezifität garantiert werden kann, sollte ein sichererer Weg der Anti-C3-Gewinnung beschritten werden. Für die Immunisierung sollte nämlich ein bereits hochgereinigtes C3 verwendet werden, das keinerlei andere Serumproteine mehr enthält. Nur so schien die Garantie für ein von vornherein monospezifisches Anti-C3-Ziegenserum gegeben zu sein. Es wurde ein Weg der C3-Reinigung gesucht, der einerseits hohe Reinheit des Präparates sichert, andererseits aber in der Durchführung einfach genug ist, um ihn nicht nur in spezialisierten Labors durchführen zu können. Dieser Kompromiß scheint mit der hier

angegebenen Methode erreicht zu sein. So ist es möglich, aus menschlichem Plasma innerhalb von 9 Tagen C3 zu isolieren, das sich in der analytischen PAA als rein erweist.

Mit diesem reinen C3 wurde eine Ziege immunisiert, deren Serum sich danach in Hinblick auf humane Serumproteine als monospezifisch erwies (siehe Seite 35). Aus diesem Grunde war für die Weiterbearbeitung des Anti-C3-Ziegenserums die Anwendung der Standardmethoden für die 7s-IgG-Reinigung ausreichend, ohne auf Absorption zurückgreifen zu müssen. Der Vorteil des in dieser Arbeit beschriebenen Weges liegt darin, daß der hohe methodische Aufwand nicht der Reinigung der großen Mengen des Antiserums gilt, sondern der kleinen Menge von C3 für Immunisierungszwecke. Mit einer Charge C3 lassen sich mehrere Immunisierungen vornehmen. Die Gewinnung der IgG-Fraktion aus dem Anti-C3-Ziegenserum ist dagegen relativ einfach.

Bei der Wahl des Fluoreszenz-Farbstoffes war zu beachten, daß dieser eine hohe Leuchtkraft haben und in einem von dem FITC gut unterscheidbaren Farbton fluoreszieren sollte. Diese Eigenschaften schienen in dem Lissamin-Rhodamin am ehesten gegeben zu sein: Lissamin-Rhodamin besitzt nach dem FITC die höchste Leuchtkraft bei einer Fluoreszenz in einem hellen orange-rot (20, 40). Bei der Verwendung des Lissamin-Rhodamin der Fa. Serva (siehe Seite 24) bereitete die Kopplung des Farbstoffes an die Proteine keine großen Schwierigkeiten; sie wurde gemäß der Gebrauchsanweisung für diesen Farbstoff durchgeführt.

Die genaue Charakterisierung des so gewonnenen Rhodamin-Anti-C3 war insofern schwierig, als der genaue Proteingehalt des fluoreszenzmarkierten Präparates mit den üblichen Labormethoden nicht bestimm-

bar war (siehe Seite 40). Da das Rhodamin-Anti-C3 reines IgG enthält und sich in der Immunelektrophorese als rein erweist, wurde die Bestimmung des Antikörpergehaltes mittels der Agglutination-Methode und der C3-Bindungskapazität (siehe Seite 37/38) für ausreichend gehalten. Es zeigte sich ein erheblich höherer spezifischer Antikörpergehalt als in den kommerziellen FITC-Anti-C3-Seren.

Für die vorliegenden Färbungen wurde unverdünntes Rhodamin-Anti-C3 verwendet, um den Grad der Hintergrundfärbung besser beurteilen zu können. Obgleich dieser gering erschien und die Beurteilbarkeit nicht beeinträchtigte, ergeben verdünntere Lösungen einen entsprechend dunkleren Hintergrund bei noch gut erhaltener spezifischer Färbung.

An dieser Stelle soll noch kurz auf die Probleme der phototechnischen Wiedergabe der Fluoreszenz-Bilder eingegangen werden. Es zeigte sich, daß das Rhodamin bei längerer UV-Bestrahlung schneller verblaßte als das FITC. Bei der Durchmusterung der Präparate spielte diese Erscheinung keine große Rolle. Da jedoch beim Photographieren dieser Bilder Belichtungszeiten von 3-5 Minuten notwendig waren, erschien später auf den Farbdiaspositiven die grünliche Färbung im Verhältnis zum rötlichen Farbton stärker zu sein, als dies ursprünglich der Fall war. Dieser Faktor ist bei der Betrachtung der Bilder von derartigen Doppelfärbungen zu berücksichtigen. Eine zweite Schwierigkeit ergab sich bei der Herstellung von Papierabzügen (durch ein Photogeschäft) der Diaspositive von Monofärbungen mit Rhodamin-Anti-C3. Da bei diesen Bildern aus unerklärlichen Gründen die C3-haltigen Zellen gelb statt orange-rot erschienen, wurden diese Bilder mit einem Farbnegativfilm photographiert.

Die Wahl des histologischen Präparates fiel auf den Dünndarm. Dieser schien deshalb besonders geeignet, weil im submukösem Bindegewebe IgA-haltige Zellen regelmäßig und in reichlicher Zahl vorhanden sind. Diese lassen sich gut mit einem FITC-Anti-IgA anfärben. In Voruntersuchungen von Dünndarmbiopsien mit FITC-markiertem Anti-C3 war weiterhin aufgefallen, daß ebenso regelmäßig und reichlich C3-haltige Zellen im submukösem Gewebe nachweisbar sind (unveröffentlichte Beobachtungen von E. M. LEMMEL und U. BOTZENHARDT).

Die IgA-haltigen Zellen lassen sich morphologisch von den C3-haltigen Zellen unterscheiden. Die Dünndarmbiopsie erschien wegen des Nebeneinanders von zwei Zelltypen, die von zwei Fluoreszenz-Präparaten (FITC/Rhodamin) gut unterscheidbar angefärbt werden können, zum Einsatz der Doppelfärbungen besonders geeignet. Besser als bei einem Antigen-Antikörper-Komplement-Komplex, von dem in der Einleitung die Rede war, läßt sich hier die sichere Differenzierungsmöglichkeit zwischen den von dem FITC-Anti-Ig und den von dem Rhodamin-Anti-C3 angefärbten Strukturen zeigen.

Von aufwendigen Spezifitätskontrollen für das Rhodamin-Anti-C3 kann bei der beschriebenen Methode für dieses Präparat abgesehen werden, da dieses Anti-C3 bereits nach der Gewinnung von der Ziege monospezifisch war. Die Möglichkeit von Antikörpern gegen andere Humanserumproteine ist bereits durch den hohen Reinheitsgrad des Immunisierungsmaterials verhindert worden. Auf Absorption mit Leberpulver etc. kann deshalb verzichtet werden. Das Rhodamin-Anti-C3 bewies seine Monospezifität in der Immunelektrophorese und bei einer Färbung eines mit dem

Anti- β_{1C}/β_{1A} (Behringwerke) vorinkubierten Dünndarmschnittes. Nach dieser Vorinkubation blieb die Färbung durch das Rhodamin-Anti-C3 aus, weil alles C3 bereits durch das Anti- β_{1C}/β_{1A} besetzt war. Die Tatsache, daß keinerlei andere Strukturen durch das Rhodamin-Anti-C3 angefärbt wurden, ist ein weiterer Beweis für die Monospezifität dieses Präparates.

Ob die mit dem Rhodamin-Anti-C3 markierten Zellen das nachgewiesene C3 selbst synthetisieren oder lediglich durch Phagozytose oder Pinozytose aufgenommen haben, kann mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht differenziert werden.

Für die Anwendung derartiger Doppelfärbungen ergeben sich mannigfaltige Möglichkeiten. Ihr Hauptanwendungsgebiet wird die Aufklärung von Krankheitsbildern sein, bei denen immunologische Phänomene ablaufen oder vermutet werden. Man ist heute in der Lage, aus fast jedem Gebiet des menschlichen Körpers mittels Biopsie Gewebematerial zu entnehmen. Mit Hilfe der in dieser Arbeit beschriebenen Methode wird man Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen der histologischen Präparate, besonders in der Kombination Anti-IgG/Anti-C3, anfertigen, um pathogenetisch wirksame "Immunprodukte", z.B. Antikörper-Komplement-Komplexe nachzuweisen. Der übliche Nachweis von IgG und C3 mittels FITC-markierten Antiseren auf zwei verschiedenen, nacheinanderfolgenden Gewebsschnitten ist nicht beweiskräftig für einen solchen Komplex. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode ermöglicht es, einen solchen Komplex auf einem Gewebsschnitt und an einem Gewebsbestandteil nachzuweisen. Nur auf diese Weise läßt sich der Beweis eines immunpathologischen Geschehens erbringen.

Die Anwendung derartiger Doppelfärbungen kann dazu beitragen, den Pathomechanismus immunologisch bedingter Krankheitsbilder aufzuklären und letztlich auch Möglichkeiten einer kausalen Therapie zu finden.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erforschung immunologisch bedingter Krankheiten mit Hilfe von fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen nimmt ständig an Bedeutung zu. Beweisend für ein immunpathologisches Geschehen ist nur der Nachweis eines Antikörper-Komplement-Komplexes an einem Gewebsschnitt. Dies ist möglich mit Hilfe von Fluoreszenz-Doppelfärbungen, bei denen ein Anti-Ig-Serum und ein Anti-C3-Serum, mit je verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, verwendet werden.

In dieser Arbeit ist die Gewinnung eines mit Rhodamin markiertem Anti-C3 beschrieben worden.

Für die proteinchemische Reinigung der dritten Komplementkomponente (C3) ist ein Isolierungsschema entwickelt worden, das, ausgehend von menschlichem Plasma, aus sechs Reinigungsschritten besteht. Das Ergebnis war ein C3, das sich in der analytischen Polyacrylamidgel-Elektrophorese als rein erwies.

Mit diesem C3 wurde eine Ziege immunisiert.

Das gewonnene Anti-C3-Ziegenserum erwies sich als monospezifisch für humanes C3. Aus diesem Anti-C3-Ziegenserum wurden die 7s-IgG gewonnen und mit einem Rhodamin-Farbstoff, dem Lissamin-Rhodamin, markiert.

Dieses Rhodamin-markierte Anti-C3 und ein FITC-markiertes Anti-IgA (Behringwerke) wurden für die Einfachfärbungen und für Doppelfärbungen von menschlichen Dünndarm-Saugbiopsien verwendet.

Es zeigten sich:

1. eine spezifische Anfärbung von C3-haltigen Zellen im submukösem Gewebe des Dünndarms;

2. eine spezifische Anfärbung von IgA-haltigen Zellen im submukösem Gewebe des Dünndarms und
3. bei den Doppelfärbungen eine gute Differenzierungsmöglichkeit der zellulären Strukturen, die von dem FITC-Anti-IgA und dem Rhodamin-Anti-C3 angefärbt worden sind.

Für die Untersuchungen von bioptischem Material ergab sich somit eine praktische Anwendungsmöglichkeit solcher Doppelfärbungen, die zur weiteren Aufklärung immunpathologischer Krankheitsbilder führen können.

G. LITERATUR

1. Andrada, J.A., Mengone, A., Lavieri, J.C., Mancini, R.E.:
Antispermatic antibodies in patients with mumps
orchitis;
J. Reprod. Fertil., 18, 61 (1969)
2. Arbesman, C.E., Reisman, R.E.:
Serum sickness and human anaphylaxis; in:
Samter, M. (Hrsg.): Immunological diseases;
Little, Brown and Company, Boston 1971
3. Bear, R.L., Harber, L.C.:
Allergic eczematous contact dermatitis; in:
Samter, M. (Hrsg.): Immunological diseases;
Little, Brown and Company, Boston 1971
4. Bianco, C., Nussenzweig, V.:
Theta-bearing and complement receptor lymphocytes
are distinct populations of cells;
Science, 173, 154 (1971)
5. Bianco, C., Patrick, R., Nussenzweig, V.:
A population of lymphocytes bearing a membrane
receptor for antigen-antibody-complement-complexes.
I. Separation and characterization;
J. Exp. Med., 132, 702 (1970)

6. Bitter-Suermann, D.:
Das C3-Proaktivator-System. Zugänge zur Schlüsselfunktion der dritten Komplementkomponente (C3);
Habilitationsschrift, Mainz 1972
7. Bitter-Suermann, D., Hadding, U., Melchert, F.,
Wellensiek, H.J.:
Independent and consecutive action of C5, C6 and C7 in immune hemolysis. I. Preparation of EAC1-5 with purified guinea pig C3 and C5;
Immunochemistry, 7, 955 (1970)
8. Bokisch, V.A., Müller-Eberhard, H.J., Cochrane, C.G.:
Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of a human anaphylatoxin inactivator of human serum;
J. Exp. Med., 129, 1109 (1969)
9. Cochrane, C.G., Müller-Eberhard, H.J.:
The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth component of human complement;
J. Exp. Med., 127, 371 (1968)
10. De Weck, A.L., Blum, G.:
Recent clinical and immunological aspects of penicillin allergy;
Int. Arch. Allerg., 27, 221 (1965)

11. Dias da Silva, W., Eisele, J.W., Lepow, I.H.:
 Complement as a mediator for inflammation.
 III. Purification of the activity with anaphyla-
 toxin properties generated by interaction of the
 first four components of complement and its
 identification as a cleavage product of C3;
 J. Exp. Med., 126, 1027 (1967)

12. Dierich, M., Bitter-Suermann, D., König, W., Hadding, U.,
 Galanos, C., Rietschel, E.T.:
 Analysis of bypass activation of C3 by endotoxic
 LPS and loss of this potency;
 Immunology, 24, 721 (1973)

13. Dixon, F.J.:
 The role of antigen-antibody-complexes in diseases;
 Harvey lect., 58, 21 (1962-63)

14. Dixon, F.J., Vazquez, J.J., Weigle, W.O., Cochrane, C.G.:
 Pathogenesis of serum sickness;
 Arch. Path., 65, 18 (1968)

15. Doniach, D.:
 Thyroid autoimmune disease;
 J. Clin. Path., 20, Suppl., 385 (1967)

16. Fulthorpe, A.J., Roitt, I., Doniach, D., Couchman, K.H.:
 A stable sheep cell preparation for detecting
 thyreoglobulin-antibodies and its clinical application;
 J. Clin. Path., 14, 654 (1961)

17. Gigli, I., Nelson, R.A.:
Complement dependent immune phagocytosis.
I. Requirements for C1, C4, C2 and C3;
Exp. Cell Res., 51, 45 (1968)
18. Glasscock, R.J., Edgington, T.S., Watson, J.I., Dixon, F.J.:
Autologous immune complex nephritis induced with
renal tubular antigen. II. The pathogenetic
mechanism;
J. Exp. Med., 127, 573 (1968)
19. Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.:
The C3-activator system: An alternate pathway
of complement activation;
J. Exp. Med., 134, Suppl. 1, 90s (1971)
20. Goldman, M.:
Fluorescenc Antibody Methods;
Academic Press, New York and London 1968
21. Hackett, E., Thompson, A.:
Anti-lens antibody in human sera;
Lancet, 2, 663 (1964)
22. Hadding, U., Dierich, M., König, W., Limbert, M.,
Schorlemmer, H.U., Bitter-Suermann, D.:
Ability of the T-cell replacing polyanion dextran
sulfate to trigger the alternate pathway of com-
plement activation;
Eur. J. Immunol., 3, 527 (1973)

23. Hill, J.H., Ward, P.A.:
C3 leukotactic factors produced by a tissue protease;
J. Exp. Med., 130, 505 (1969)
24. Holman, H.R.:
Systemic lupus erythematosus; in:
Samter, M. (Hrsg.): Immunological diseases;
Little, Brown and Company, Boston 1971
25. Huber, H., Polley, M.J., Linscott, W.D., Fudenberg, H.H.,
Müller-Eberhard, H.J.:
Human monocytes: Distinct receptor sites for the
third component of complement and for immun-
globulin G;
Science, 162, 1281 (1968)
26. Hunsicker, L.G., Ruddy, S., Austen, K.F.:
Alternate complement pathway, factors involved
in cobra venom factor (CoVF) activation of the
third component of complement;
J. Immunol., 110, 118 (1973)
27. Ishizaka, K., Ishizaka, T., Sugahara, T.:
Biological activity of soluble antigen-antibody
complexes. II. Role of antibody fragment in the
induction of biological activity;
J. Immunol., 88, 690 (1962)

28. Johnston, R.B., Klemperer, M.R., Alper, C.A.,
Rosen, F.S.:
The enhancement of bacterial phagocytosis by
serum. The role of complement components and
two factors;
J. Exp. Med., 129, 1275 (1969)
29. Katsh, S.:
Localization and identification of antispermatogenic
factor in guinea pig testicles;
Int. Arch. Allerg., 16, 241 (1960)
30. Klein, P.G., Wellensiek, H.J.:
Multiple nature of the third component of guinea
pig complement. I. Separation and characterization
of the three factors a, b and c, essential for
hemolysis;
Immunology, 8, 590 (1965)
31. Kniker, W.T., Cochrane, C.G.:
Pathogenetic factors in vascular lesions of experi-
mental serum sickness;
J. Exp. Med., 122, 83 (1965)
32. König, W., Bitter-Suermann, D., Dierich, M., Hadding, U.:
Bypass-activation of the complement system starting
with C3. II. C3-activation by gamma-1-immune
aggregates in guinea pig serum;
Immunochemistry, 10, 431 (1973)

33. Lay, W.H., Nussenzweig, V.:
Receptor for complement on leukocytes;
J. Exp. Med., 128, 991 (1968)
34. Leddy, J.P.:
Immunological aspects of red cell injury in man;
Seminars Hemat., 3, 48 (1966)
35. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein measurement with the Folin phenol reagent;
J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
36. Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, F.J.:
Immunochemical quantitation of antigens by single
radial immunodiffusion;
Immunochemistry, 2, 235 (1967)
37. Maurer, H.R.:
Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Poly-
acrylamidgel-Elektrophorese;
Walter de Gruyter und Co., Berlin 1968
38. Mayer, M.M. in: Kabat, E.A., Mayer, M.M.:
Experimental Immunochemistry;
Ch. C. Thomas, Springfield, Ill. (USA) 1961
39. Müller-Eberhard, H.J., Nilsson, U., Aronsson, T.:
Isolation and characterization of two β_1 -glyco-
proteins of human serum;
J. Exp. Med., 111, 201 (1960)

40. Nairn, R.C.:
Fluorescent Protein Tracing;
E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1964

41. Nelson, R.A.:
Immune adherence; in :
Grabar, P., Miescher, P.A. (Hrsg.):
Immunopathology; 2nd International Symposium;
Schwabe und Co., Basel-Stuttgart 1962

42. Nilsson, U.R., Müller-Eberhard, H.J.:
Isolation of β_{1F} -globulin from human serum and
its characterization as the fifth component of complement;
J. Exp. Med., 122, 277 (1965)

43. Ouchterlony, Ö.:
Gel diffusion techniques; in :
Ackrodt, J.F. (Hrsg.): Immunological Methods;
Blackwell Scientific Publ., Oxford 1964

44. Ringelmann, R., Opferkuch, W., Röllinghoff, M., Loos, M.:
Komplementmessung mit Hilfe des Mikrolitersystems;
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol., 154, 329 (1969)

45. Roitt, I.M., Doniach, D., Campbell, P.N., Hudson, R.V.:
Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid
goitre);
Lancet, 2, 820 (1965)

46. Rother, K. (Hrsg.):
Komplement: Biochemie und Pathologie;
Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1974
47. Sallman, L. von, et al.:
Retinal and uveal inflammation in monkeys following
inoculation with homologous retinal antigen;
Arch. Ophthalm., 81, 374 (1969)
48. Samter, M. (Hrsg.):
Immunological diseases; 2nd edition;
Little, Brown and Company, Boston 1971
49. Scheidegger, J.J.:
Une micro-méthode d'immunoélectrophorese;
Intern. Arch. Allerg. Appl. Immunol., 7, 103 (1955)
50. Schnellmann, D.C., Aronson, S.B.:
The relationship between autoantibody and sympathetic uveitis;
Arch. Ophthalm., 75, 213 (1966)
51. Shulmann, N.R.:
A mechanism of cell destruction in individuals sensitized to foreign antigens and its implication in auto-immunity;
Ann. Intern. Med., 60, 506 (1964)

52. West, C.D., Davis, N.C., Forristal, J., Herbst, J.,
Spitzer, R.:
Antigenetic determination of human β_{1C} - and
 β_{1G} -globulins;
J. Immunol., 96, 650 (1966)
53. Wirostko, E., Spalter, H.F.:
Lens-induced uveitis;
Arch. Ophthal., 78, 1 (1967)
54. Zvaifler, N.J., Conroy, M.C., Lepow, I.H.:
Complement derived cleavage products with
leukotactic activity generated by streptococcal
proteinase;
Fed. Proc., 30, 355 (1971)

H. LEBENSLAUF

Am 23. April 1947 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Willy Baum und dessen Ehefrau Hildegard, geb. Dunkelmann, in Hellendorf, Kreis Burgdorf (Hannover) geboren.

In den Jahren 1954 - 1958 besuchte ich die Volksschule Grimsehlweg in Hannover-Bothfeld. Nach Abschluß der 4. Grundschulklasse besuchte ich von Ostern 1958 bis September 1966 das neusprachliche Gymnasium Großburgwedel (Hannover), wo ich das Abitur bestand.

Zwischenzeitlich hielt ich mich von August 1964 bis Juli 1965 als Austauschschüler des "Youth for Understanding" in Michigan, USA auf, wo ich die Abschlußklasse einer Senior High School besuchte und das amerikanische High School Diploma erwarb.

Im Frühjahr 1966, vor meiner Musterung, reichte ich einen Antrag auf Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer bei dem Prüfungsausschuß des Kreiswehersatzamtes Hannover ein. Bis zur Verhandlung im März 1967 arbeitete ich als Straßenbahnschaffner bei den hannoverschen Verkehrsbetrieben.

Mein ziviler Ersatzdienst begann im November 1967, in dem ich als Krankenpfleger in zwei Hamburger Krankenhäusern arbeitete (Elisabeth - und Amalie-Sieveking - Krankenhaus). Im April 1969 endete mein ziviler Ersatzdienst.

Mit dem Sommersemester 1969 begann ich mein medizinisches Studium an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel. Am 10. 4. 1970 bestand ich das Vorphysikum, am 15. 7. 1971 das Physikum.

Seit dem Wintersemester 1971/72 studiere ich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz.

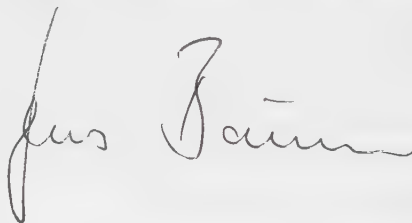
Als Famulus war ich 5 Wochen im Sommer 1972 in der chirurgischen Abteilung des St. Josefs-Hospitals in Wiesbaden und 8 Wochen im Frühjahr 1974 in der II. Medizinischen Universitätsklinik in Mainz tätig.

Die vorliegende Dissertation wurde im Herbst 1972 im Institut für Mikrobiologie in Mainz (Direktor: Prof. Klein) begonnen und im Winter 1974 abgeschlossen.

Im Juni 1974 erhielt ich die Zulassung zur Ärztlichen Prüfung, die vom Juli bis Dezember 1974 dauert.

Seit Mai 1972 bin ich mit Christiane Baum, geb. Struck, verheiratet. Sie arbeitet als Dipl.-Bibliothekarin an der Stadtbibliothek Mainz. Im Dezember 1972 wurde unsere Tochter Heike geboren.

Mainz, im September 1974

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'J. Baum'. The signature is written in dark ink on a light background.

